

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Elméleti és evolúciobiológia program

**MIKROBA KÖZÖSSÉGEK FAJÖSSZETÉTEL-VIZSGÁLATA:
A MULTITEMPLÁT PCR ÉS A DGGE ELEMZÉSE**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

SIPOS RITA



Témavezető:
DR. MÁRIALIGETI KÁROLY
egyetemi docens

Doktori Iskola vezető:
DR. ERDEI ANNA
egyetemi tanár

Programvezető:
DR. SZATHMÁRY EÖRS
egyetemi tanár

ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék

**Budapest
2009**

„The true method of discovery is like the flight of an aeroplane. It starts from the ground of particular observation; it makes a flight in the thin air of imaginative generalization; and it again lands for renewed observation rendered acute by rational interpretation.”

Alfred North Whitehead (1861-1947)

matematikus, filozófus

In Process and Reality: An Essay in Cosmology (1929)

„A felfedezés igazi módszere olyan, mint egy repülőgép útja: a részletes megfigyelés talajáról indul, majd a képzelet általánosításának ritka levegőjében száll, hogy végül leszálljon a racionális magyarázattal pontosított újbóli megfigyelés talajára.”

fordította: Náfrádi Attila

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok:

Dr. Márialigeti Károlynak, témavezetőmnek, hogy a Mikrobiológiai Tanszéken lehetővé tette számomra disszertációm elkészítését, és munkámat értékes szakmai útmutatásaival segítette.

Dr. Nikolausz Marcellnek, társ-témavezetőmnek, a téma megálmodójának, hogy bevezetett a molekuláris módszerek rejtelseibe, töretlenül hitt munkánk sikerében és szakmai és emberi kvalitásával egyaránt felbecsülhetetlen segítséget nyújtott a nemzetközi publikációk és disszertációm megírásához.

Dr. Vida Gábornak és **Dr. Szathmáry Eörsnek**, hogy lehetővé tették számomra az Elméleti és evolúciobiológia doktori programban való részvételemet.

„*Charlie Angyalainak*”, **Dr. Székely Annának** és **Dr. Révész Sárának**, akikkel éjszakákba nyúló, hasznos szakmai eszmecsereket folytathattunk; és a hosszú doktoranduszi úton mindvégig emberileg támogattak; számíthattam segítségükre akkor is, amikor fizikailag akadályoztatva voltam.

Szakdolgozómnak **Palatinszky Mártonnak**, akivel együtt küzdöttük meg a modellrendszer felállításával és a T-RFLP mérések beállításával kapcsolatos nehézségeket.

Dr. Micsinai Adriennek és **Dr. Vladár Péternek** a mintavételeknél nyújtott felbecsülhetetlen lelkesedésükért és segítségükért.

Romsics Csabának, aki mindig derűvel töltötte meg a munkás hétköznapokat, köszönöm segítségét a mindenmű hardveres és szoftveres problémák megoldásához,

Nyíró Gábornak, aki minden követ megmozgatott, hogy a legelső közösségi T-RFLP mintánkat lefuttathassuk.

Doktorandusztársaimnak, **Felföldi Tamásnak** és **Vajna Balásznak**, hogy közösen elmélkedhettünk a mikrobiális ökológia rejtelsein, és hasznos észrevételeikkel hozzájárultak a disszertációm összeállításához.

A **Mikrobiológiai Tanszék** valamennyi munkatársának, akik rengeteget segítettek munkámban.

Végül, de nem utolsó sorban **családomnak**: **szüleimnek**, **testvéremnek**, **férjemnek** és **gyerekeimnek**, valamint, és **barátaimnak** a fáradhatatlan türelmükért és óriási lelki segítségükért a munka eredményességébe vetett rendületlen hitért; nélkülük ez a disszertáció soha sem készült volna el. **Csabikám, az X-szárnnyú a Tied lehet!**

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS	3
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
II.1 A nukleinsav-alapú molekuláris módszerek térnyerése a mikrobiális ökológiában	4
II.1.a A 16S rRNS gén-alapú mikrobiális közösség vizsgálatok széleskörű alkalmazása	6
II.2 A mikroba közösségek diverzitás vizsgálatának lehetőségei és korlátai	9
II.3 A nukleinsav izolálás során felmerülő hibalehetőségek	13
II.4 A multitemplát PCR fajösszetétel torzító hatásai	15
II.4.a A PCR működése és a heterogén templát problematikája	15
II.4.b A templát genomi tulajdonságai (genomméret, rrr operonszám, G+C%)	16
II.4.c A PCR termékek re-annélációjának gátló hatása	18
II.5 A multitemplát PCR primer megválasztása	19
II.5.a Egy általános oligonukleotiddal szemben támasztott követelmények	19
II.5.b Kompromisszum a primer specificitás és a hozam között	19
II.5.c Az „univerzális” 16S rRNS génre specifikus primerek problematikája	20
II.5.d Primertervezés alapjai és a tesztelés fontossága	21
II.5.e Primer nomenklatúra	24
II.6 PCR körülmények hatása	27
II.6.a PCR hőmérséklet profilok	27
II.6.a.1 Touch down PCR	28
II.6.b PCR ciklusszám	29
II.6.b.1 A multitemplát PCR során keletkező melléktermékek	30
II.6.b.2 „Nested” PCR	31
II.7 DNS polimeráz enzim különbségek	33
II.8 T-RFLP molekuláris „ujjlenyomat” módszer	34
II.9 DGGE molekuláris „ujjlenyomat” módszer	36
III. CÉLKITŰZÉSEK	39
IV. ANYAG ÉS MÓDSZER	42
IV.1 Mintavétel	42
IV.1.a A modell kísérletekben használt törzsek	42
IV.1.b Rizoszféra és rizoplán minták a demjéni szennyvíztisztító mesterséges lápról	42
IV.1.c Gombakomposzt minták	44
IV.1.d Tiszta tenyészetek izolálása komposzt mintából	45
IV.2 DNS izolálás	46
IV.2.a DNS izolálás törzsekből	46
IV.2.b DNS izolálás környezeti, rizoszféra és rizoplán mintából	46
IV.2.c DNS izolálás komposzt mintából	46
IV.3 DNS mennyiség meghatározása	47
IV.4 A tisztított DNS illetve PCR termék detektálása	47
IV.5 16S rRNS gén szaporítása PCR segítségével	47
IV.5.a Modellrendszer kidolgozása és megbízhatóságának tesztelése	50
IV.5.b Multitemplát PCR termékek előállítás törzsekből és környezeti mintákból	50
IV.5.c Az annélációs hőmérséklet hatásának vizsgálata	51
IV.5.d A PCR ciklusszám hatásának vizsgálata	52
IV.5.e A komposzt minták PCR-DGGE elemzése	54
IV.5.f Rizoszféra és rizoplán minták PCR-DGGE elemzése	55
IV.5.g DGGE gél különböző részeiből visszanyert DNS vizsgálata	56
IV.6 A PCR termékek tisztítása	56
IV.7 Restriktációs endonukleáz emésztés	56
IV.8 T-RFLP elemzés (minta előkészítés, CGE és ujjlenyomat detektálás)	57
IV.9 DGGE elemzés (gélöntés, gélelektroforézis és ujjlenyomat detektálás)	58
IV.10 DGGE gélikivágás, DNS eluálás, újra amplifikálás	60
IV.11 16S rRNS gén bázissorrend elemzése	60

IV.12	Filogenetikai elemzések	62
IV.13	Primer illeszkedés vizsgálatok a <i>Ribosomal Database Project</i> alapján	62
IV.14	Molekuláris „ujjlenyomatok” statisztikai elemzése	63
IV.14.a	T-RFLP mintázatok elemzése	63
IV.14.b	DGGE mintázatok elemzése	63
V.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEŚÜK	66
V.1	Esettanulmány: Gombakomposzt mikroba közösségének vizsgálata	66
V.1.a	Problémafelvetés és háttérinformáció	66
V.1.b	Mikrobiális szukcesszió követése	67
V.1.b.1	Tenyésztés	67
V.1.b.2	PCR-DGGE feldolgozás	67
V.1.c	Tenyésztés-molekuláris elemzéssel kapott diverzitás eltérésének felderítése	69
V.1.d	Az Actinobacteria detektálás problematikájának feltárása	71
V.1.d.1	Sejtfeltárás hatékonyságának tesztelése	72
V.1.d.2	PCR szelektivitás ellenőrzése és korábbi korlátai	72
V.1.d.3	Az RDP 10.12 szerint adatbázis létrehozása és a primerek tesztelése	73
V.1.e	Összegzés	83
V.2	Modellrendszer felállítás	84
V.2.a	A törzsek terminális fragmentumainak meghatározása in silico és empirikus módszerekkel	84
V.2.b	A restrikciós enzimek kiválasztása	85
V.2.c	A restrikciós emésztés és a CGE elválasztás megbízhatóságának tesztelése	88
V.2.d	Összegzés	91
V.3	A multitemplát PCR paramétereinek vizsgálata	92
V.3.a	Az primer illeszkedési hiba (mismatch) hatása	92
V.3.b	Az annelációs hőmérséklet változtatásának hatása	94
V.3.c	A PCR ciklusszám változtatásának hatása	99
V.4	Modellrendszer eredményeinek tesztelése környezeti mintákon	100
V.4.a	Összegzés	105
V.5	Rizoszféra frakciók PCR-DGGE molekuláris „ujjlenyomata” a 16S rRNS gén különböző variábilis régióinak vizsgálatával	106
V.5.a	A PCR-DGGE molekuláris „ujjlenyomatok” felbontása és általános elemzése	106
V.5.b	Az egyenként elemzett DGGE mintázatok eredménye	110
V.5.c	A négy primerpár DGGE mintázata egyesített elemzésének eredménye	117
V.5.d	Összegzés	121
V.6	A DGGE gél különböző részeiből visszanyert DNS vizsgálata	122
VI.	EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE	128
VI.1	A multitemplát PCR-alapú diverzitás elemző módszerek vizsgálata	128
VI.2	Legfontosabb eredményeink	129
VI.3	Ajánlások környezeti minták 16S rRNS gén alapú molekuláris feldolgozásához	131
VII.	IDÉZETT IRODALOM	133
VIII.	ÖSSZEFOGLALÓ	146
IX.	SUMMARY	147
X.	FÜGGELÉK	i
X.1	A 63F primer illeszkedése a <i>Bacteria</i> divíziók 16S szekvenciáihoz (RDP 10.12)	i
X.2	Adatbázis 10 univerzális 16S rRNS génre specifikus primer illeszkedésvizsgálata	ii
X.3	16S rRNS gén szekvenciák megoszlása a <i>Bacteria</i> divíziók között (RDP 10.12)	iii
X.4	A 968F-1401R (IV-es primerpár) primerek illeszkessége (RDP 10.12)	iv
X.5	A 27F-1492R primerek illeszkedése (RDP 10.12)	v
X.6	A 341F-534R (III-as primerpár) primerek illeszkedése (RDP 10.12)	vi
X.7	A 907R-1387R primerek illeszkedése (RDP 10.12)	vii
X.8	Rövidítésjegyzék	viii
X.9	Ábra-, és táblázatjegyzék	ix

I. BEVEZETÉS

A legkorszerűbb bázissorrend elemzési technikák elterjedésével az egyes élőhelyekről az egyre nagyobb mértékben rendelkezésre álló szekvencia adatok alapján mind több, a tudomány számára új mikroba csoportot fedeznek fel, ami újra és újra bizonyítja a mikroba közösségek elképesztő diverzitását. Azonban ezen taxonómiai csoportokról leginkább csak annyit tudunk, hogy léteznek.

A mikrobiális ökológus célja az egyes élőhelyekre jellemző közösségek fajösszetétel-felépítésének megismerése mellett a közösség tér-, és időbeli dinamikájának és anyagsere viszonyainak valósághű feltérképezése. A tenyésztésbe vonható fajok kis száma (ca. 0,1-1%) készítette a kutatókat a tenyésztéstől független, molekuláris biológiai módszerek alkalmazására, amellyel egyúttal sokkal több minta feldolgozása is megvalósulhat. A mikrobiális közösségek diverzitás vizsgálata a különböző funkcionális és/vagy filogenetikai marker gének elemzésén alapszik. A nukleinsav-alapú módszerek nagy többségének előfeltétele a környezeti mintákból kinyert DNS vagy RNS molekulák polimeráz láncreakcióval (PCR, vagy RT-PCR) történő enzimatis feldolgozása. A mikrobiális diverzitás vizsgálatok mind a mai napig legintenzívebben kutatott területe a 16S riboszómális RNS gén elemzése. A PCR során keletkező több faj ampikonjából álló kevert PCR termék szétválasztására számos módszert alkalmaznak. A leggyakrabban alkalmazott módszer a molekuláris klónozás, majd az egyedi klónok összehasonlító bázissorrend elemzése. Korábban feltételezték, hogy az adott klónkönyvtár domináns szekvenciái a vizsgált közösség domináns tagjait reprezentálják. Nem szabad azonban megfeledkezni arról, hogy amikor PCR-alapú diverzitás vizsgálatok során a közösség összetételére vonatkozóan következtetéseket teszünk, ezt minden esetben fenntartással kezeljük, mivel a molekuláris mintafeldolgozás minden egyes lépése hibalehetőségeket rejt magában.

Egyetlen faj genomi DNS-e esetében a PCR technika exponenciális kinetikája igen jól tanulmányozott. Azonban a mikrobiális ökológiában a közösségek, akár több ezer féle kevert DNS templátja esetében a PCR során bekövetkező mennyiségi változásokról még kevés ismerettel rendelkezünk. Törekednünk kell a multitemplát PCR-ben lejátszódó folyamatok pontos megismerésére, hogy a PCR körülményeket ne csupán az elvárt hozam alapján válasszuk meg, hanem, hogy az esetlegesen fellépő aránytorzító hatásokat kiküszöböljük, vagy legalábbis csökkentjük.

Kutatásaink során egyszerű baktérium törzsekből álló modellrendszerben és környezeti mintákon vizsgáltuk a multitemplát PCR templát-termék aránymódosulásait, különös tekintettel az alkalmazott 16S rRNS gén primerek specifikusságára és a PCR kísérleti körülményeire (hőmérséklet és ciklusszám). Vizsgáltuk továbbá a molekuláris ujjlenyomat módszerek alkalmazásában rejlő hibalehetőségeket.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1 A nukleinsav-alapú molekuláris módszerek térnyerése a mikrobiális ökológiában

Az 1880-as évektől Robert Koch munkásságának köszönhetően, a mikrobiológusok kutatásai középpontjába a „kézzelfogható”, Petri-csészékben szilárd táptalajokon izolált és fenntartott tiszta tenyészetek (elsősorban patogén szervezetek) morfológiai, és fiziológiai vizsgálata került. Míg a mikrobiológia tudományának 19. századi megközelítése a Koch módszerével izolált mikroorganizmusok tiszta tenyészeire, afféle statikus rendszerekre szorítkozott; a 20. század elején megjelent a mikroorganizmusokat egymással kölcsönható, dinamikus rendszerként vizsgáló szemlélet is. A „tiszta tenyészet” koncepcióval szemben az új szemlélet – amelyet Sergei Winogradsky képviselt – a „kevert” sejtpopulációk összetett kölcsönhatását és függőségi viszonyát hangsúlyozta (Penn és Dworkin, 1976), megalapozva ezzel a modern mikrobiális ökológiát.

A problémát nem csupán az jelentette, hogy az egyes tiszta tenyészetek a fenntartás során sem minden esetben voltak állandóak (pl. különböző telep morfortípusok), hanem egyre inkább előtérbe került a tenyésztésbe nem vont/vonható mikroorganizmusok problematikája, amikor a mikrobiológusok arra a döbbenetes ellentmondásra bukkantak, miszerint a hagyományos telepszámláláson (CFU: *colony forming unit*, telepképző egység) alapuló módszernél a direkt mikroszkópikus sejtszámlálás alapján rendre több nagyságrenddel nagyobb értékeket kaptak. A jelenséget Staley és Konopka (1985) „a nagy telepszámlálási anomáliaként” (*the great plate count anomaly*) nevezte meg, utalva a nagymértékű eltérésekre. Egyes vízi környezetekben egészen drasztikus, esetenként 4-6 nagyságrenddel is nagyobb élő sejtszám értékeket mértek (Grimes *et al.*, 1986). A különböző becslések alapján talajmintákból az összes csíraszám alapján a baktériumoknak csak mintegy 0,1-1,0%-a izolálható és tartható fenn tiszta tenyészetként (Torsvik *et al.*, 1990; Torsvik és Ovreas, 2002).

A hagyományos lemezöntésen alapuló diverzitásvizsgálatok azokat a fajokat azonosítják a közösség domináns tagjaiként, melyek a tenyésztési körülményekhez legjobban képesek alkalmazkodni. Elméletileg minden baktérium tenyésztésére ki lehet kísérletezni olyan egyedi tenyésztési körülményeket és táptalajösszetételt, amelyen az adott mikroba laboratóriumi keretek között tenyészetben fenntartható. Gyakorlatilag azonban ilyen mértékben specifikus táptalajokat a baktérium fajok nagy száma miatt sem áll módunkban előállítani; továbbá nagyon kevés információval rendelkezünk a mikrobák természetes élőhelyén valóságosan ható környezeti tényezőket illetően (szignál vegyületek és anyagcseretermékek speciális transzport rendszere, kémiai anyagok koncentráció gradiens mentén történő megoszlása, heterogén fizikai környezet stb.). A tenyésztethető és valóságban

létező baktériumok számának nagyarányú különbsége többek között azzal is magyarázható, hogy az egyes mikrobák a természetben egymással szoros kölcsönhatásban élnek, amely kölcsönös függőségi kapcsolatrendszer a hagyományos tenyésztési technikák során, laboratóriumi körülmények között nagyon nehezen, vagy egyáltalán nem tartható fenn. Azonban az *in vitro* növekedésre képes mikrobák még nagyobb arányú tenyésztésére rengeteg új módszert fejlesztenek napjainkban, amelyekkel próbálják a speciális környezeti körülményeket még pontosabban modellezni [pl. oligotróf környezetet tükröző természetes vagy kis tápanyagtartalmú táptalajok, hosszabb inkubációs idő, szignál vegyületek, mesterséges gradiensek és diffúziós technikák segítségével (Nichols, 2007)]. A klasszikus tenyésztési és a fenotipikai bélyegek vizsgálatán alapuló módszerek idő és pénzigényes eljárások, amelyből adódóan nem igazán használhatóak nagy mennyiségű környezeti minta feldolgozására, pl. szezonális dinamika követésére.

Olyan módszerek kidolgozása vált szükségessé, amelyek segítségével a természetes baktérium közösségekről sokkal reprezentatívabb képet kaphatunk, amely egyúttal láthatóvá teszi számunkra a klasszikus módszerekkel nem feltérképezhető mikrobiális diverzitást. Elsőként a genomiális DNS bázisösszetételét (mol%-os G+C tartalom) és a hibridizációs módszerekkel kimutatható hasonlóságait vizsgálták (Torsvik *et al.*, 1990). Később a figyelem középpontjába az élőlényekben univerzálisan megjelenő riboszómális RNS (rRNS) került. Az úttörő újítást Carl Woese munkája hozta, amely bebizonyította, hogy a riboszómális RNS gén szekvenciák evolúciós kronométerként használhatóak, és az élőlények filogenetikai rendszerbe sorolhatók riboszómális RNS-ük összehasonlító elemzése alapján. Így alkotta meg az élővilág három domén alapú rendszerét (Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990). Korábbi filogenetikai vizsgálatok a citokróm-c fehérje aminosavsorrend elemzésére épültek, ezt váltották fel a közvetlenül nukleinsavra épülő molekuláris törzsfejlődéstani rendszerek. Az rRNS molekulát kódoló gén filogenetikai célú vizsgálatát a molekula sajátos tulajdonságai tették lehetővé:

- ősi, esszenciális terméket kódol (a fehérjeszintézist végző riboszómák építőköveit), ami minden sejtes életformában univerzálisan előfordul (*Bacteria*, az *Archaea* és az *Eukarya*)
- a molekula erősen konzervatív és különböző fokú variabilitást mutató régiókból áll
- alegységes felépítésű, az egyes domének szekvencia szakaszai eltérő evolúciós sebességgel változnak, lehetővé téve különböző szintű/mélységű filogenetikai viszonyok feltérképezését.

Az aktív sejtekben a riboszómális RNS-ek nagy mennyiségben megtalálhatóak, így könnyen hozzáférhetőek direkt, vagy enzimatisz reverz transzkripció útján történő szekvencia meghatározás számára (Lane *et al.*, 1985). Az első kutatások az 5S rRNS elektroforetikus szétválasztására és jellemzésére szorítottak (Stahl *et al.*, 1985). Idővel egyre

inkább a SSU 16S (SSU -small subunit, ca. 1540 bázis) és LSU 23S (LSU -large subunit, ca. 2900 bázis) rRNS gén vizsgálatokra helyeződött a hangsúly, mivel az 5S rRNS molekula méretéből adódóan (ca. 120 bázis) nem hordoz elegendő információt. Pace és munkatársai rámutattak arra, hogy az így szerzett filogenetikai ismeretanyag felhasználható olyan oligonukleotidok tervezéséhez, amelyek nagy valószínűséggel hibridizálnak bizonyos vagy éppen számos bakteriális csoport örökítőanyagához (csoportspecifikus vagy univerzális bakteriális primerek és próbák) (Stahl *et al.*, 1985). A gyors RNS és DNS bázissorrend elemzési módszerek elterjedésével elegendő információ gyűlt össze egy átfogó rRNS génalapú bakteriális filogenetika felvázolásához, továbbá a *Bacteria* doménen belül sikerült különböző csoportokra (α -, β -, δ - és γ -*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, stb.) karakterisztikusan jellemző rövidebb rRNS gén szekvenciákat azonosítani (Manz *et al.*, 1992; Roller *et al.*, 1994; Amann *et al.*, 1995).

II.1.a A 16S rRNS gén-alapú mikrobiális közösség vizsgálatok széleskörű alkalmazása

A nagy áttörést 1985-ben a polimeráz láncreakció (*Polimerase Chain Reaction*, PCR) feltalálása jelentette, amiért Kary B. Mullis-t 1993-ban Nobel-díjjal is jutalmazták (Mullis *et al.*, 1986). A mikrobiális ökológiában az rRNS gének PCR-rel történő szaporítását elsőként Giovannoni és mtsai (1990) használták a Sargasso-tenger bakterioplankton közösségének 16S rRNS gén klónkönyvtár alapú vizsgálatához; és munkájukkal sikerült egy addig ismeretlen csoportot azonosítaniuk (SAR11). A PCR technika hihetetlen mértékben járult hozzá a molekuláris biológiai technikák térnyeréséhez a mikrobiális ökológiában, és a tenyésztéstől független, PCR-re épülő módszerek mind a mai napig tartó töretlen fejlődéséhez. Legintenzívebben ma is a 16S rRNS molekula vizsgálatával foglalkoznak. A 16S rRNS gén szekvenciákra kiépült több, jól használható, ellenőrzött adatbázis is [*Ribosomal Database Project* RDPII (Cole *et al.*, 2009); ARB (Ludwig *et al.*, 2004); SILVA (Pruesse *et al.*, 2007), Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006)]. Az adatbázisokban található 16S rRNS szekvenciák túlnyomó többsége nem-tenyésztett fajokból származik, hiszen a gént leginkább a komplex mikrobaközösségek tenyésztéstől független diverzitás elemzésére használják. Az ismert és leírt *Bacteria* és *Archaea* fajok száma mindössze pár ezer (1. ábra), míg talajok esetén a baktérium-fajszámot 100 000/g-ra becsülik (Torsvik *et al.*, 1990). A legújabb *high throughput* bázissorrend elemzési technikák elterjedésének köszönhetően (Hall, 2007; Hamady és Knight, 2009) az elmúlt években a nyilvános adatbázisokban található szekvenciák száma robbanásszerűen megnőtt (1. ábra SILVA és 16. ábra RDP). A legújabb piroszekvenálási technikák (harmadik generációs 454 *sequencing*) segítségével már >400 bp hosszú szekvenciák nyerhetők hihetetlen hatékonysággal (ca. 500Mb/futás) (Hall, 2007), ezáltal drasztikusan lecsökkentve az egy bázisra eső előállítási költségeket.



1. ábra. A leírt fajok számának és a SSU rRNS szekvenciák számának változása 1980 és 2007 között. A SILVA release 93-alapján, Yarza és mtsai nyomán (2008).

Mi sem szemlélteti jobban a szekvenciák áradatát, mint hogy a disszertációmban részletesen elemzett a RDP 10.12-es verziója még **920 643** (2009. június), míg a disszertációm benyújtásakor az RDP 10.15 verziója már **1 104 383** elillesztett 16S rRNS gén szekvenciát tartalmazott (2009. október). A függelékben található táblázat mutatja az RDP adatbázis validált 34 *Bacteria* és 4 *Archaea* divízióba tartozó 16S rRNS gén szekvenciák megoszlását (a *candidatus* divíziók száma ennél jóval nagyobb) a tenyésztésbe vont törzsek, illetve a környezeti mintákból származó szekvenciák között az egyes taxonómiai csoportokon belül. A *Bacteria* csoportok között 4 divíziónak egyáltalán nincs tenyésztett tagja, illetve további hét csoportban 7-nél kevesebb tenyésztett törzset ismerünk (RDP-10.12).

A bakteriális taxonómiában a 16S rRNS gén szekvenciájának kitüntetett szerepe van: ismerete fontos, de nem elégséges feltétele egy faj meghatározásának. A gyakran félreértelmezett „97%-os szabály” csupán azt állapítja meg, hogy ennél kisebb szekvencia hasonlóság esetében biztosan külön fajba tartozik a vizsgált törzs. Ellenben, a 97% feletti 16S rRNS gén szekvencia homológia nem jelenti feltétlenül az egy fajba tartozást (Stackebrandt és Goebel, 1994), bár egyesek a fajok valós létezését is megkérdőjelezik. A nemzeti és annál magasabb taxonómiai kategóriákba soroláshoz a 16S rRNS gén megfelelő felbontással rendelkezik, illetve elemzése fontos annak eldöntéséhez, hogy a kérdéses taxonon az adott típus törzs DNS-DNS hibridizáción alapuló összehasonlítását el kell-e végezni (70% feletti hasonlósági érték azonos fajt jelent). A közelmúltban Soria-Carrasco és mtsai (2007) igazolták a 16S rRNS-alapú mikrobiális taxonómia jelenkori létjogosultságát. Vizsgálatuk tárgyát a teljes genom ismeretében, a *Salinibacter ruber* M31 típus törzs képezte, amelynek pontos filogenetikai pozíció-meghatározásához, precíz kritériumok alapján 22 fehérjét kódoló háztartási gént választottak és elvégezték bázissorrend elemzésüket (12 más *Bacteroidetes* és *Chlorobi* divíziókba tartozó törzsek genom adata segítségével). Igaz, hogy a géneket egyenként vizsgálva eltérő topológiájú filogenetikai törzsfákat kaptak (a fák 3 nagyobb

topológiai típusra különültek el); azonban a 22 gén együttes elemzésével kapott törzsfa igen nagy *bootstrap* (99-100) értékek mellett azonosnak adódott a korábbi 16S rRNS alapján számított filogenetikai viszonyokkal. Ismét megerősítést nyert, hogy a SSU rRNS-alapú taxonómiai osztályozás megfelelő módszer, baktérium törzsek genusz vagy annál magasabb filogenetikai csoportba való besorolásához (Soria-Carrasco *et al.*, 2007).

A legfrissebb kezdeményezés a 16S rRNS-alapú filogenetika összefogásához az „*All-Species Living Tree*” megalkotása, amely az összes, ez ideáig szekvencia alapján meghatározott *Archaea* és *Bacteria* típus törzseket (6782 db típus törzs) tartalmazó 16S rRNS filogenetikai törzsfa létrehozása, a szekvenciák és a másodlagos szerkezetek pontos ismeretében (Yarza *et al.*, 2008). A terv kivitelezői a lehető legprecízebben jártak el: manuálisan, egyenként válogatták ki a legjobb minőségű, megfelelő hosszúságú, manuálisan korrigált illesztésű 16S rRNS gén szekvencia adatokat. A végleges törzsfában a törzsgyűjteményekben meghatározott prokarióta fajok 91%-a szerepel. A törzsfa topológiájának megbízhatósága érdekében ca. 3200 további szekvenciát is felhasználtak, hogy a törzsekkel kevésbé reprezentált csoportok helyzete is stabil legyen. Ezeket a szekvenciákat a végleges verzióból eltávolították. Az eredményeik megerősítésére a jövőben tervezik más filogenetikai markerek bevonásával tesztelni a törzsfa topológiájának megbízhatóságát (Yarza *et al.*, 2008). A megalkotott első verzió vitathatatlan érdemei közé tartozik, hogy:

- egyértelműen megmutatkoznak/azonosíthatóak az összetartozó/koherens illetve a feltételezhetően következetlen/inkoherens taxonok
- az utóbbi csoport vagy nem koherensen kapcsolódik a genusz többi tagjához, vagy éppen egy másik nemzetségbe ágyazódva jelenik meg a törzsfában
- a fa alapján egyes para-, illetve polifiletikus taxonnak tűnő csoportok besorolását érdemes újragondolni (pl. *Eubacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* és *Desulfotomaculum* nemzetségek)
- statisztikai számítások alapján a típus törzshöz viszonyított szekvencia azonosság minimum értékét egy nemzetségen (*genus*) belül $94,9\% \pm 0,4$ -ban határozták meg
- ugyanez az érték családon belül (*family*) $87,5\% \pm 1,3$; és egy divízió esetében (*phylum*) $78,4\% \pm 2,0$; amely értékek az egyes besorolások empirikus megfigyelésén alapszanak.

Az „*All-Species Living Tree*” neves szakemberek munkájának érdeme, amely megbízható szekvencia adatbázisok adataival dolgozik (ARB, SILVA és az érvényes fajneveket tartalmazó LPSN lista), és amelyet a jövőben havonta terveznek frissíteni.

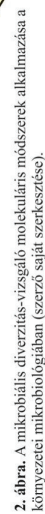
A metagenom- és funkcionális marker gén-alapú mikrobiális közösség elemzések korszakában továbbra is igen elterjedtek a 16S rRNS-alapú közösségi diverzitás vizsgálatok. Gyakran használják a „klasszikus” 16S rRNS-alapú közösség vizsgáló módszereket például a

metagenom elemzések megelőző lépéseként, annak eldöntésére, hogy az adott mintát milyen bázisrendszert elemzési módszerrel vizsgálják (Tringe és Hugenholtz, 2008).

II.2 A mikroba közösségek diverzitás vizsgálatának lehetőségei és korlátai

A különböző ökológiai vizsgálatoknál elengedhetetlen annak ismerte, hogy az adott közösséget milyen fajok alkotják és melyek a közösségen belül a domináns, meghatározó csoportok. A modern mikrobiális ökológia célja azonban, hogy egy adott élőhely mikroba közösségének strukturális és funkcionális diverzitását egyaránt feltárja. A strukturális diverzitás jelenti a közösséget alkotó fajok összetételét és abundanciáját; azt az általuk képviselt genetikai potenciált, amit a közösségi funkcionális géntárháza jelent. A funkcionális diverzitás alatt pedig az ezen gének kifejeződésével megvalósuló fenotípust értjük. Molekuláris szinten kifejezve azt kell meghatároznunk, hogy egy mikrobiális rendszerben milyen gének, milyen gyakoriságban és eloszlásban vannak jelen, milyen mértékű a diverzitásuk illetve mely gének aktívak egy adott közösségben (Larkin *et al.*, 2005).

Minden mikrobiális diverzitás-vizsgáló módszer más oldaláról közelíti meg a közösségek leírását, ezáltal más szeletét tárja fel számunkra (2. ábra). A különböző élőhelyeken megvalósuló, bonyolult anyagcsere-rendszereket alkotó mikroba közösségek mibenlétéről teljes képet talán soha sem kaphatunk; azonban a molekuláris technikák fejlődésével és az újonnan leírt fajok segítségével remélhetőleg egyre közelebb kerülünk a valósághoz. A mikrobiális ökológia tudományterületén belül napjainkban is parázs vita folyik a mikrobiális diverzitás leírásának **tenyésztéses és tenyésztéstől független** módszere mellett kardoskodók között (Nichols, 2007; Ritz, 2007). Nem akarok pálcát törni egyik nézet felett sem, ugyanis meggyőződésem, hogy a vita nem a tenyésztésbe vonható baktérium fajok pontos százalékos arányának meghatározásán dőlhet el. (A tenyészthető fajok számának 0,1-1% körüli értékét egyesek alulbecslésnek, mások túlbecslésének vélik.) Mindkét megközelítés ugyanannak a bakteriális diverzitásnak a megismerésére irányul, azonban jellegükből adódóan a molekuláris és a hagyományos módszerek is más technikák segítségével vizsgálódnak, és ebből kifolyólag más problémákba ütköznek. Ez okozhatja, hogy gyakran a tenyésztéssel és a tenyésztéstől független elemzéssel kapott eredmények kevéssé egyeznek (Donachie *et al.*, 2007). A hagyományos lemezelési módszerrel a laboratóriumi körülmények között könnyen szaporodó taxonokra szelektálunk, és a kitaróképletek segítségével dormans állapotban túlélő fajok arányát túlbecsüljük.



A molekuláris megközelítéssel pedig az alkalmazott nukleinsav izolálási technika és PCR során használt körülmények szelektivitása okozhatja a két megközelítés eredményének csekély átfedését. A valós viszonyok megismerése az ún. **polifázikus** megközelítéssel, a különböző módszerekkel kapott eredmények együttes elemzése útján lehetséges. A polifázikus megközelítés egyaránt magába foglalja a tenyésztésen-alapuló és tenyésztéstől független módszerek és ezen belül a lehető legtöbb technika közös alkalmazását (pl. Pearce mtsai (2003) bakterioplankton közösség vizsgálata során 16S rRNS gén és FAME alapú törzs identifikációt kombináltak FISH, DGGE és klónkönyvtár készítéssel.). Az azonban bizonyosnak tűnik, hogy a bakteriális diverzitás mértékének becslésére és statisztikai kiértékelésre a tenyésztéses módszerek kevésbé alkalmasak, mint a molekuláris módszerek.

A különböző molekuláris módszerek összefoglaló ábráján feltüntettem az egyes technikák ismertetésére szolgáló szakirodalmi hivatkozásokat (2. ábra), azonban a disszertáció terjedelmi korlátai miatt a módszerek egyenkénti részletes bemutatására nem térek ki (az általam használt két molekuláris „ujjlenyomat” módszert röviden ismertetem a fejezet végén). Számos jól használható módszertani összefoglaló mű is született a különböző típusú mikroba közösségek vizsgálatára: rizoszféra-, (Sørensen *et al.*, 2009); szennyezett talajok és vizek-, (Malik *et al.*, 2008); vizes élőhelyek- (Dorigo *et al.*, 2005); szennyvíz-, (Gilbride *et al.*, 2006) és élelmiszer-mikrobiológia (Jany és Barbier, 2008; Justé *et al.*, 2008) szakterületeken.

A molekuláris módszerek tárháza tehát szinte kimeríthetetlen, rendszeresen fedeznek fel új technikákat, vagy éppen a már meglévő rutinszerűen használt rendszereket ötvözik az új technikák vívmányaival (pl. WCGA: *whole community genome array*; 2. ábra), azonban a megfelelő technika kiválasztását természetesen behatárolja a rendelkezésre álló műszerpark és anyagi erőforrás. A módszer és azon belül alkalmazott körülmények megválasztásának minden esetben előfeltétele a precízen megfogalmazott **kérdésfeltevés** (mi a vizsgálat pontos célja), és semmi esetre sem szabad figyelmen kívül hagyni a tanulmányozni kívánt minta, élőhely jellegzetességét sem. Mindezek alapján több szempontot is mérlegelni kell:

- milyen **mennyiségű minta** áll rendelkezésre (lehetséges-e elégséges célmolekula tömeget előállítani, a mintafeldolgozást ismétlésekben elvégezni)
- szükséges-e a vizsgált mikroba közösség összetételére vonatkozó bármilyen előzetes ismerettel rendelkezniünk [pl. RSGP (*reverse sample genome probing*) módszer alkalmazásához tenyésztett törzsek ismerete szükséges]
- nukleinsav-alapú módszerek alkalmazását a környezeti minta fajtájától függően visszamaradt **szennyező** anyagok gátolhatják (pl. huminsavak, nehézfém szennyezések, stb. a PCR reakciót gátolják)
- multitemplát **PCR-alapú** diverzitás elemzés esetén a **teljes bakteriális diverzitás**, vagy **célzott taxonómia csoportok** vizsgálata a cél. Az előbbi esetben jól használhatók a 16S

rRNS gén különböző szakaszai vagy más háztartási gének (*rpoB*: RNS-polimeráz béta alegység; *recA*: rekombináz enzim; *gyrB*: DNS-giráz alegység). Célzott csoportok vizsgálata történhet a fentebb említett gének variábilisabb szakaszaira tervezett primerek segítségével; vagy egyes baktériumcsoportokra specifikusan jellemző anyagsere folyamatokat irányító kulcsenzimeket kódoló gének vizsgálatával (pl. metanogénre a metil *koenzim-M redukáz* (*mcrA*); szulfátredukálókra a disszimilatórikus szulfít redukáz (*dsrAB*); ammónia-oxidáló baktériumokra az ammónia monooxygenáz (*amoA*).

- a kérdéses taxonok **kimutatására** és/vagy **azonosítására** (pl. klónozás, FISH, DGGE, SNUPE) is szükségünk van
- **kvalitatív** (ARDRA, RISA), **szemi-kvantitatív** (T-RFLP, SNUPE) vagy **kvantitatív** (qPCR, FISH) eredményeket várunk
- a kapott filogenetikai információ **ismert funkcióhoz** kapcsolható-e (SIP, RSGP).

Az eredményeink értékelésénél mindig figyelembe kell venni az alkalmazott módszerek korlátait és meg kell vizsgálni a teljes minta-feldolgozási munkafolyamatot az egyes lépésekben rejlő hibalehetőségek szempontjából:

1. mintavételezés, mintatárolás
2. molekuláris marker molekulák izolálása és tisztítása
3. PCR vagy nem PCR alapú (WGA) felszaporítás
4. különböző elválasztási technikák

A disszertációmban behatóan a nukleinsav-alapú molekuláris „ujjlenyomat” módszerek (*fingerprinting techniques*) és az alapjukat képező multitemplát PCR technika (2. ábra) templát-termék aránymódosulásait vizsgáltuk. A környezeti mikrobiológiában a molekuláris „ujjlenyomat” módszerek a kevert, több fajból álló PCR amplikonok különböző technikákkal történő elválasztásával egy speciális, az adott mikrobaközösségre jellemző mintázatot (*fingerprint*) eredményeznek. A multitemplát PCR lépés az ujjlenyomat módszerek zömének és a molekuláris klónozásnak is előfeltétele, ugyanis önmagában a közösségi nukleinsav izolátum mennyisége a sikeres elválasztáshoz nem elégséges. Korábbi kutatásaink során több molekuláris „ujjlenyomat” módszer (ARDRA, DGGE és T-RFLP) kritikai összehasonlító elemzését végeztük rizoszféra baktérium közösségek diverzitás vizsgálatában (Sipos, 2002; Nikolausz, 2003). A vizsgált módszerek alkalmazhatóságának legfontosabb szempontja a közösséget alkotó taxonok elválasztásának érzékenysége és hatékonysága volt (a közösség összetételéről nyerhető információ minősége és mélysége). Az alap problematikát az jelenti, hogy a PCR-t és a mikrobiális ökológiában alkalmazott módszerek jelentős hányadát az orvosi diagnosztikából vették át (pl. DGGE, SNUPE, MDA). Ezeket a módszereket specifikus kimutatásokra és ebből adódóan egyféle rendszerre, egyféle templátra dolgozták ki (pl. a DGGE módszert egy élőlény/szervezet egy génjének pontmutáció

detektálására). Egyik módszert sem terveztek és optimalizáltak olyan komplex rendszerekre, mint amilyen a talajok vagy üledékek diverz mikrobiotája.

A nukleinsav izolálást követően a módszerek közös pontja a multitemplát PCR lépés, amelyben a PCR templátjaként homológ gének keveréke szolgál, amelyből meghatározott gének konzervatív régióira tervezett speciális oligonukleotidok (primerek) segítségével szaporíthatók a vizsgált gének (filogenetikai és/vagy funkcionális). Ideális esetben a multitemplát PCR-rel a közösségben jelenlévő összes taxon DNS-e sokszorozható a kiindulással megegyező arányokban. A valóságban azonban rengeteg olyan tényező hatásával számolnunk kell, amelyek az eredeti közösségben fellelhető arányokat befolyásolja; egyes esetekben olyan mértékű torzítást okozva, hogy a PCR termékben bizonyos csoportok a kimutathatósági határérték alatt keletkeznek, ezáltal a közösségi mintázatokban, vagy klónkönyvtárban nem kimutathatók. A mintafeldolgozás minden lépésénél fellépnek hibalehetőségek, azonban a PCR, a reakció jellegéből fakadóan, az eredeti templát arányok legsúlyosabb torzítását okozhatja; mivel a PCR reakció exponenciális volta miatt a korai ciklusok alkalmával jelentkező eltérések hatványozódnak, és az ezzel járó összetétel módosulások negatív hatását a PCR-t követő lépések is „öröklik”. Korábban feltételezték, hogy egy klónkönyvtár domináns szekvenciái, vagy ujjlenyomat mintázatok erős denzitású csíkjai, vagy az elektroferogramokon megjelenő nagy csúcsok a vizsgált közösség domináns tagjait reprezentálják. Nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy megállapításainkat nem a valós közösség tagjaira vonatkoztatva, hanem csak a közösségből izolált nukleinsavból (feltehetően a közösség összes tagjának genetikai anyagát tartalmazó) előállított kevert PCR termék OTU/filótípus összetételére vonatkoztatva tehetjük meg. Ahhoz, hogy a vizsgált mikroba közösségről a legpontosabb, valósághű képet nyerhessük, meg kell ismernünk a multitemplát PCR során fellépő aránymódosulásokat és ezek jellegét; hogy az információt felhasználhassuk a rutin molekuláris mintafeldolgozás során a torzítások kiküszöbölésére, vagy legalábbis a minimalizálására. A továbbiakban a multitemplát PCR során fellépő hibalehetőségeket ismertetem részletesen, amelyet a PCR kiindulását képező nukleinsav izolátum előállítás problematikájával vezetek be.

II.3 A nukleinsav izolálás során felmerülő hibalehetőségek

A PCR reakciók sikertelenségének leggyakoribb oka a DNS templát nem megfelelő minősége, ezért kell nagy gondot fordítani a nukleinsav izolálás (DNS és/vagy RNS) körülményeire. A multitemplát PCR kimenetelét erősen meghatározza a templát koncentrációja és tisztasága. Komplex környezeti mintáknál (talaj vagy rizoszféra) alapvetően kétféle eljárás létezik: a sejtek *in situ* lizisen alapuló, **direkt** extrakciós módszer (Ogram *et al.*, 1987); és az **indirekt módszer**, amely során első lépésben a sejteket különítik el a mátrix

állománytól és csak ezt követően történik meg a sejtek lízise, a nukleinsavak kinyerése (Holben *et al.*, 1988). A közösség összetételéről nyert képet erősen torzíthatja, hogy a különböző sejtek eltérő mértékben kötődnek a minta mátrixának anyagához (pl. talajszemcsékhez), ezért reprezentatívabb képet kaphatunk a direkt nukleinsav izoláláson alapuló módszerekkel.

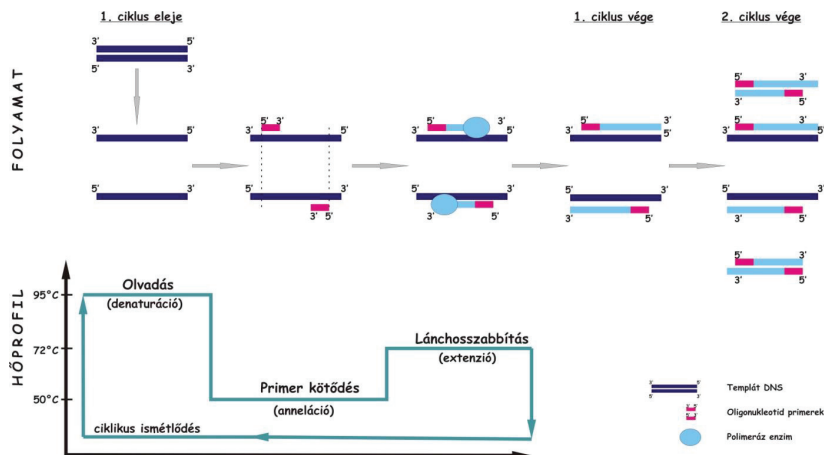
A közösségek strukturális diverzitásának feltérképezésére leggyakrabban direkt DNS-alapú vizsgálatokat használnak, amely eljárással az élő sejtek mellett az elpusztult sejtek illetve a kitartó képletek (spórák) DNS tartalmát is izolálják. Az indirekt eljárás DNS hozama alulmarad (a közösség 25-50%-a visszanyerhető) a direkt módszerek DNS hozamához képest (60%), azonban a kinyert DNS nagy tisztaságú és nagyobb méretű, kevésbé fragmentálódott (Sørensen *et al.*, 2009). Az izolált DNS mennyisége talajok esetében erősen függ a minta fizikai-kémiai tulajdonságaitól (pH, vegetáció, víztartam, agyagásvány tartalom), amit a megfelelő technika kiválasztásánál figyelembe kell venni (Sagova-Mareckova *et al.*, 2008). Szintén erősen torzíthatja a közösség összetételére vonatkozó vizsgálatokat, hogy az eltérő sejtfelszerkezettel rendelkező sejtek különböző mértékben tárolnak fel (Gram pozitív és Gram negatív sejtek), hiszen a nem felnyíló sejtek nukleinsav tartalma a továbbiakban nem képezi részét a későbbi PCR templátnak. A sejtek feltárásához leghatékonyabb módszernek a különböző **fizikai** (sejtmalmozós rázatás, folyékony nitrogénes porítás, hősokk, mikrohullám, ultrahangos sejtfeltárás), **kémiai** (detergensek) és **enzimatikus** (lizozim, proteináz K) módszerek **kombinációját** ajánlják (Frostegard *et al.*, 1999). A kivont nukleinsavat a további feldolgozás (PCR) előtt feltétlenül érdemes tisztítani, napjainkban ez leginkább szilikát-alapú mátrix rendszerekkel történik. Nagy huminsav tartalmú talajminták esetében nagy gondot okoz a nukleinsav-izolátumban visszamaradó huminsav tartalom, amit, mivel a további PCR reakciókat gátolhatja, a megfelelő technikával eliminálni szükséges [PVPP és/vagy sepharose gél (Lakay *et al.*, 2007)]. Továbbá meg lehet próbálkozni a templát DNS hígításával, amellyel egyben a szennyező anyag is hígul, ami eredményezhet a gátlási koncentrációnál kisebb huminsav tartalmat. Ekkor azonban számolni kell a templát koncentráció változásának hatásával.

A mikrobiota aktivitásáról az RNS alapú vizsgálatok szolgálnak információval. Riboszómális RNS vizsgálatok során az aktív, nagy riboszóma állománnyal rendelkező csoportok azonosítására nyílik lehetőség. Az mRNS vizsgálatával pedig a feltételezhetően a ténylegesen fehérjére átíródó génekről, és azok expressziójáról nyerhetünk információt. Azonban az RNS-alapú vizsgálatok kevésbé elterjedtek, mivel a kinyert RNS mennyisége kicsi és a molekulák gyors bomlása, valamint az RNáz enzimek egyetemes jelenléte miatt a RNS izolálás módszertani nehézségekbe ütközik. Léteznek olyan eljárások, amellyel párhuzamosan történik egy adott mintából a DNS és az RNS kinyerése (Griffiths *et al.*, 2000).

II.4 A multitemplát PCR fajösszetétel torzító hatásai

II.4.a A PCR működése és a heterogén templát problematikája

A genomiális DNS egyes szakaszainak sikeres PCR-es szaporításához speciális összetevőkre (templát DNS, primerek, dNTP, polimeráz enzim), és ideális reakció körülményekre (puffer közeg, Mg^{2+} koncentráció, pH, hőmérséklet) van szükség. Az PCR nevéből adódóan ciklikus láncreakció, amelyben az összesen ca. 20-40 ciklus alatt a képződő termék molekulák száma ciklusonként megkettőződik, hatványozódik (2^n db amplitkon keletkezik, ahol „n” a ciklusszám; 3. ábra).



3. ábra. Egy általános PCR reakció és ciklikus hőprofil folyamatának vázlata.

A sokszorozáshoz első lépésben, nagyobb hőmérsékleten a hidrogénhíd kötések megbontásával a duplaszálú DNS templát *denaturációja* (szálak elválása) történik, amelyet egy kisebb, a primerek által meghatározott optimális hőmérsékleten a főlegben lévő primerek hibridizációja követ. Utolsó lépésben a kialakult primer-templát hibrid molekulán a polimeráz enzim, az optimumának megfelelő hőmérsékleten, a dNTP-eket a DNS szálnak megfelelő komplementer pozíciókba beépíti, és ezáltal az eredeti templát DNS szál komplementerét szintetizálja (Atlas és Bej, 1994). A láncreakció két vagy három szakaszból álló hőprofillal írható le, de legelterjedtebbek a háromlépéses protokollok, ahol a primerek bekötése (*annezáció*) és a lánchosszabbítás (*extenzió*) külön hőmérsékleten zajlik.

Egyetlen, homogén templát esetében a PCR reakció kinetikája jól ismert (Kubista *et al.*, 2006), azonban a mikrobiális ökológiában legtöbbször teljesen ismeretlen összetételű és igen diverz, heterogén minták szolgálnak a PCR számára kiindulási templátként. Számos feltétel,

amely biztosíthatná, hogy a különböző templatok azonos hatékonysággal sokszorozódjanak – azaz a templatok kiindulási arányait a PCR termék összetételében pontosan reprodukálhassuk – több okból kifolyólag sem teljesülhet (von Wintzingerode *et al.*, 1997):

- nem egyforma mértékben hozzáférhetőek a primer számára a különböző templat molekulák célszekvenciái
- a primer és templat hibridek kötődésének ereje eltérő mértékű (*primer binding energy*)
- az újonnan szintetizálódó szálakat nem egyforma hatékonysággal hosszabbítja a polimeráz enzim
- a szubsztrátok fogyása nem egyformán érinti a különböző templatok lánchosszabbítását (*template exhaustion effect*).

A **differenciális amplifikáció** – a templatonként eltérő hatékonyságú szaporítás – eredményezi az eredeti templat arányok módosulását, a valós közösség összetételének torzulását, amely a PCR-es szaporítást követő lépések kimenetelét alapvetően meghatározza. Továbbiakban a differenciális amplifikációt befolyásoló tényezőket ismertetem.

II.4.b A templat genomi tulajdonságai (genomméret, *rrn* operonszám, G+C%)

A közösségben az egyes taxonok eltérő egyedszámban vannak jelen, azonban a genomi nukleinsav állományuk PCR-alapú szaporításának hatékonyságát az egyes egyedek eltérő genomi tulajdonságai jelentősen befolyásolják. Többek között a genomszám, a genomméret és a PCR primerek által megcélzott gének kópia száma fontos tényező. A baktériumok genommérete viszonylag kicsi (<15MB), az 500-15 000 kilobázis (kB) tartományon belül egészen változatos lehet. Azonban a genomok mérete és génösszetétele nem állandó, a különböző környezeti hatások, mobilis genetikai elemek integrálódása, deléciók és duplikációk a genomokat folyamatos dinamikus változásban tartják. A prokarióták genomi tulajdonságai összefüggést mutatnak az adott mikroorganizmus ökológiai stratégiájával, környezetének tulajdonságaival. A szabadon élő baktériumok genomja nagyobb (5 000-15 000 kB), míg a fakultatív vagy obligált szimbionták és patogének reduktív folyamatok miatt kisméretű genommal rendelkeznek (500-1 500 kB) (Nilsson *et al.*, 2005; Ochman és Davalos, 2006). A baktériumokban léteznek egy kópiában meglévő gének (pl. az *rpoB* háztartási gén), azonban éppen a riboszómális gének változatos számú és elrendezkedésű operonokba (*rrn*) rendeződnek (ritkán akár külön kromoszómán). Egy genomon belül a 16S rRNS operonok száma 1-15 között változik (átlag 4,1 operon/genom), (Case *et al.*, 2007). Bizonyítást nyert, hogy a generalista baktériumok – amelyek a környezeti tényezők kedvezőé válása esetén gyorsabb reagálásra/szaporodásra képesek – genomjukban nagyobb számú rRNS operonnal rendelkeznek, mint a specialista egyedek (spóráképző *Bacillus subtilis*

10, a *Clostridium paradoxum* 15, míg a Lyme-kórt okozó *Borrelia burgdorferi* csupán 1 operonnal rendelkezik; (Klappenbach *et al.*, 2000).

Ismert genomméret és operonszám adatok esetén lehetséges operon gyakoriság értéket használva 16S rRNS kópiaszámot kalkulálni.¹ Ez az érték azonban önmagában nem elégséges információ, ugyanis közismert, hogy az operonok számossága mellett egyaránt fontos az operonok elhelyezkedése is. PCR amplifikálási hatékonyság szempontjából nem mindegy, hogy a különböző *rrn* operonok a genomban egyenletesen eloszolva, vagy mint egyes *Bacillus* genusoknál, kisebb tömbökbe rendeződve találhatók meg. Feltételezhetően az egymás mellett lévő operonok gyorsabban átíródnak, mint a szétszórtan elhelyezkedők (Klappenbach *et al.*, 2000). Farreley és mtsai (1995) a genomméret és az *rrn* operonszám hatását vizsgálva tapasztalta, hogy ismert genomi tulajdonságú baktériumok genomi DNS-ének keverékét használva a PCR termék összetételében egyes esetekben jelentős eltéréseket kaptak a genom tulajdonságokból kalkulált arányokhoz képest, amelyet az *rrn* operonok sűrűségével/elhelyezkedésével magyaráztak, de bizonyítani nem tudtak. A genomi tulajdonságok változatossága nehezen korrigálható tényező ismeretlen összetételű közösségek esetében, és nagymértékben megnehezítik a közösségek összetételére vonatkozó kvantitatív következtetéseket. Egy egyed genomján belül ismertek teljesen azonos szekvenciájú *rrn* operonok, de számos esetben írtak le eltérő nukleotid összetételű operonokat, szekvencia heterogenitást egy szervezeten belül. Crosby és Criddle (2003) az *rrn* operonok genomon belüli szekvencia heterogenitásának hatását mesterségesen generált molekuláris „ujjlenyomat” mintázatok (LH-PCR, ARISA, DGGE, T-RFLP) alapján elemezte. Eredményeiből arra következtettek, hogy bár különböző mértékben, de mindegyik módszer által generált közösségi mintázatban hamis OTU diverzitást okozott az operonok heterogenitása. Davis és mtsai (2003) egy fitoplazma esetében tapasztalták az eltérő szekvenciájú riboszómális operonok (*rrnA* és *rrnB*) megjelenését a klónkönyvtárban; és bizonyították az egyik operon preferenciális amplifikációját, amelyet a PCR-nél használt primer és az adott operon szekvenciája között meglévő illeszkedési hibával igazoltak.

Fontos genomi tulajdonság a DNS molekula mol%-os G+C tartalma is, ami szintén okozhat preferenciális amplifikációt. A nagy G+C tartalmú templatok nehezebben, míg a kis G+C tartalmú templatok nagyobb hatékonysággal denaturálódnak; így a PCR feltételezhetően a kis G+C tartalmú templatokat fogja előnyben részesíteni és ezáltal a közösségben a kis G+C tartalmú csoportok túlzott reprezentációját okozhatja. A torzítás mértéke csökkenthető denaturációt elősegítő anyagok, acetamid (5%), vagy DMSO (dimetil-szulfoxid), reakcióelegyhez adagolásával (Reysenbach *et al.*, 1992).

¹ operon gyakoriság = genomméretre vonatkoztatott operonszám érték

Az egyszálú DNS-templát által felvett másodlagos szerkezet, vagy a DNS-hez kötődő, a nukleinsav izolálás és tisztítás során el nem távolított fehérjék nagymértékben csökkenthetik a lánchosszabbítás sebességét. A primerkötő helyeket határoló régiók szerkezete is befolyásolhatja a primerkötés hatékonyságát, és a PCR kezdeti ciklusaiban fajonként eltérő mértékben gátolhatja az amplifikációt (Hansen *et al.*, 1998; Farris és Olson, 2007). Ezt a torzítást nem sikerült sem a DNS denaturálódását befolyásoló anyagokkal, sem az ún. *touch down* PCR protokollal kiküszöbölni (Hansen *et al.*, 1998).

II.4.c A PCR termékek re-annelésiójának gátló hatása

Suzuki és Giovannoni (1996) a preferenciális amplifikáció jelenségét kéttagú modellrendszerben PCR termékek mesterségesen beállított templát arányai mellett vizsgálta. Bizonyos beállításoknál a PCR termékek összetétele függetlenül a kiindulási koncentráció arányoktól az 1:1 arányhoz közelített. A jelenséget a PCR termékek re-annelésiójának gátlásával magyarázták; és „Cot-efféktusként” nevezték el, jelezve ezzel a re-annelési ó mértékének függését a kiindulási templát koncentrációtól és a PCR időtartamától (Mathieu-Daude *et al.*, 1996). A magyarázat háttérében az áll, hogy a PCR reakció előrehaladtával a termékek koncentrációja nő, míg a primerek beépülésével a szabad primerek koncentrációja csökken. Egy bizonyos határon túl a termékek nagyobb valószínűséggel és nagyobb hatékonysággal fognak egymással hibridizálni, mint magával a primer molekulával. Az emelkedő ciklusszámmal egyre kisebb valószínűséggel fog a primer-templát hibrid kialakulni. A hatás kevésbé érinti a kiindulási mintában kis számban jelenlévő templátokat, amelyek ezáltal a ciklusok előrehaladtával a kezdetinél nagyobb hatékonysággal hibridizálhatnak a primer molekulákkal. A két ellentétes hatás együttesen járulhat hozzá a nagyobb PCR ciklus számok esetén tapasztalt 1:1 arány közelítéséhez [ami azonban pontosan a ritka, kis számban jelenlévő templátok kimutathatóságát segíti elő; (Mathieu-Daude *et al.*, 1996)]. A probléma megoldásaként a PCR ciklusszámának csökkentését, vagy a templát kiindulási koncentrációjának csökkentését javasolták (Suzuki és Giovannoni, 1996).

Azonban a jelenség valószínűleg diverz környezeti minták genomi DNS-e esetében nem annyira hangsúlyos, ugyanis a templátok nagy száma mellett nem valószínű, hogy akár egy templát is olyan koncentrációban keletkezhetne, hogy a termékek egymással történő hibridizációja okán a primer-templát hibrid kialakulása akadályozva lenne. Több vizsgálat eredménye is megerősítette, hogy környezeti minták esetében, még nagy ciklusszámok sem eredményezték a Suzuki és Giovannoni által tapasztalt ciklusszám-függő torzítást (Lueders és Friedrich, 2003; Acinas *et al.*, 2005).

II.5 A multitemplát PCR primer megválasztása

II.5.a Egy általános oligonukleotiddal szemben támasztott követelmények

A közösségi DNS templát alapján és a vizsgálat céljának megfelelően megválasztott célszekvencia ismeretében tervezett oligonukleotid primer a sikeres PCR szaporítás egyik legfontosabb tényezője, ami a PCR hatékonyságát és specificitását egyaránt meghatározza. Léteznek a PCR primerekkel szemben támasztott olyan univerzális kritériumok, amelyeknek a konkrét PCR alkalmazástól és templát típusától függetlenül minden PCR reakció esetében feltétlenül teljesülnie kell. Ezen általános gyakorlati követelmények közé tartozik:

1. **optimális primer hossz** (ca. 18-28 bázis, de léteznek új PCR technikák, amelyek pl. 10 bázis hosszú oligonukleotidokat használnak [*miniprimer-PCR*, (Isenbarger *et al.*, 2008)])
2. a két primer által megválasztott **célszekvencia hossza** [ált. 100-3000 bázis, de *Long-Range PCR* és *proofreading* polimeráz segítségével a termék akár >10 kb is lehet (Kainz *et al.*, 1992)]
3. **olvadási hőmérséklet** (a két primer olvadási hőmérsékletének különbsége (ΔT_m) nem haladhatja meg az 5°C-ot)
4. **G + C tartalom** (40-60%)
5. pontos illeszkedés a primerek 3' végénél
6. **inter-, és intramolekuláris másodlagos szerkezetek elkerülése** (*hajtű szerkezet* alakulhat ki a primer molekulán belül, vagy a primerek egymással ún. *primer-dimer* (homodimer, vagy heterodimer) hibrid molekulát alkothatnak, mindkét esetben súlyosan rontják a PCR hatékonyságát, esetleg gátolják a reakciót)

II.5.b Kompromisszum a primer specificitás és a hozam között

A multitemplát PCR esetében azonban az általános primer követelmények teljesülése mellett ugyanolyan fontos szempont a preferenciális amplifikáció és az aspecifikus termékképződés kiküszöbölése. A primerek tervezésénél mindig az elméleti cél az, hogy a célszekvenciához 100%-an illeszkedő primereket alkalmazzunk, amely a reakcióelegyben lévő többi génhez ne kapcsolódhasson (*mispriming*), és mindemellett a célszekvenciánkat nagy hatékonysággal szaporíthassuk. A multitemplát PCR esetében specificitás és a PCR hozam közötti kritikus határmezsgyét a szekvenciájában hihetetlenül heterogén templát miatt nagyon nehéz körülhatárolni.

A mikrobiális közösségek vizsgálatához a kérdésfeltevés függvényében különböző célszekvenciákat választhatunk és a kiválasztott gének vizsgálatát tág-spektrumú és szűkebb spektrumú primerekkel is elvégezhetjük. A választás minden vizsgálatnál külön mérlegelést igényel. Az elsődlegesen filogenetikai markerek, mint a korábban tárgyalt 16S/23S rRNS és más konstitutívan kifejeződő, háztartási gének (Soria-Carrasco *et al.*, 2007), a közösségek

strukturális diverzitását tárják fel. A legelterjedtebb módszerek a 16S rRNS génen belül található ún. konzervatív régiókat célozzák meg, amelyek mindkét prokarióta doménra specifikusak. Az ezen szakaszokra tervezett „univerzális” oligonukleotid próbák és primerek alkalmazása azonban nem mentes alapvető specifikussági problémáktól (lásd II.5.c fejezet). A 16S rRNS gén variabilisabb szakaszainak segítségével szűkebb filogenetikai csoportokat célozhatunk meg a *Bacteria* és *Archaea* doméneken belül (Boon *et al.*, 2002; Blackwood *et al.*, 2005; Fierer *et al.*, 2005). Gyakran azonban ezek az ún. „csoport vagy taxon-specifikus” oligonukleotidok sem eredményezik a közelrokon fajok megfelelő mélységű filogenetikai feltárását.² Amikor a közösségelemzés elsődleges célja egy konkrét biológiai funkció vizsgálata, akkor az azért a funkcióért felelős gént gyakran távol-rokon taxonoknál is azonosíthatjuk. Ebben az esetben előfordulhat, hogy nagyon ősi génről van szó, de felmerül a horizontális géntranszfer (HGT) lehetősége is. Ilyen funkcionális vizsgálatokhoz használják a különböző biodegradációs útvonalak és a különféle bio-geokémiai folyamatokban (elemkőrforgalomban) résztvevő kulcsenzimek génjeit; vagy éppen rezisztencia géneket (nehézfém rezisztencia, antibiotikum rezisztencia) (Larkin *et al.*, 2005). Gyakran – nem szerencsésen – kizárólag ezeket az elemzéseket nevezik „funkcionális gén-alapú” vizsgálatoknak; de a különböző filogenetikai elemzések céljából végzett háztartási gén elemzések is szintén ebbe a csoportba sorolandóak.

II.5.c Az „univerzális” 16S rRNS génre specifikus primerek problematikája

Az ismeretlen összetételű környezeti minták mikrobiális diverzitásának feltérképezésére mind a mai napig a 16S rRNS génre tervezett széles spektrumú univerzális, azaz a *Bacteria* és *Archaea* doménekre tervezett primereket használják. Az univerzális megjelölésből kitűnik, hogy elvárásunk egy ilyen primerrel szemben az, hogy az összes létező 16S rRNS gén szekvenciájához pontosan illeszkedjen, hogy egy közösségből az összes lehetséges 16S rRNS templátot sikeresen szaporíthassuk. Azonban ilyen minden lehetséges templáttal szemben tökéletes illeszkedést mutató primer tervezése a 16S rRNS molekulák számosságából és szekvencia heterogenitásából fakadóan nem lehetséges. A bakteriális 16S rRNS szekvenciák teljesen konzervált részei a teljes gén 10%-át teszik ki, azonban ezen belül a leghosszabb összefüggő szakasz is mindössze 10 nukleotid hosszú. Tovább nehezíti a helyzetet, hogy a teljesen konzervált nukleotidok általában nem egymás mellett helyezkednek el, és a legtöbb esetben 3 bázisnál is rövidebb részeket alkotnak (Baker *et al.*, 2003). Ezen tulajdonságok mind lehetetlenné teszik, hogy minden *Bacteria* 16S rRNS gén szekvenciával 100%-os azonoságot mutató és egyben a primer követelményeknek megfelelő hosszúságú primert

² Az ammónia-oxidáló baktériumok (AOB) β -*Proteobacteria* alosztálya vizsgálatára rendelkezésre álló 16S rRNS gén alapú primerek korábban tapasztalt korlátai miatt (Purkhold *et al.*, 2000) pl. ajánlott, az AOB csoportra specifikus funkciókat végző enzimek génjeire tervezett primerek használata is.

tervezhessünk. Ráadásul további problémát jelent, hogy ismereteink csak az eddig megismert szekvenciákra szorítkozhatnak (alapsokaság), illetve, hogy az adatbázisokban deponált szekvenciák bizonyos *Bacteria* csoportokat alul-, vagy éppen túlréprezentálhatnak, amely a valóságban létező bakteriális diverzitásról alkotott képünket szintén torzíthatja. A 10-15 évvel ezelőtt leírt 16S rRNS primereket jóval kisebb méretű szekvencia adatbázis adatai alapján tervezeték, ezért a hihetetlen mértékben bővülő információk birtokában illeszkedésük felülvizsgálata indokoltnak tűnik. Óvatosan kell bánni a 16S rRNS gén két végéhez közeli szakaszokra tervezett primerekkel, hiszen az adatbázisokban szereplő szekvenciák végéről ezek a szakaszok gyakran hiányoznak (lásd 17. ábra), vagy éppen elég nagy arányban kerülnek a rendszerbe effektíve a primert és nem a primer célszekvenciáját tartalmazó bejegyzések, ún. „primer szekvencia szennyezések”. Az egyik legelterjedtebben használt univerzális 16S rRNS primer, a 27F esetében döbbenetesen nagy az aránya (37%) azoknak a szekvenciáknak, amelyekről bizonyítottan nem távolították el a nem riboszómális eredetű, primer szekvenciákat (Frank *et al.*, 2008).

II.5.d Primertervezés alapjai és a tesztelés fontossága

A primer tervezés a legfontosabb eleme a differenciális amplifikáció minimalizálásának. Mivel tökéletes primerek tervezése a fent említett nehézségek miatt nem áll módunkban, az univerzális primerek gyakran illeszkedési hibákat (*mismatch*) tartalmaznak bizonyos taxonokra, amely nukleotid pozícióban a primer és a célszekvencia nem azonos. Az illeszkedési hibák megnövelik a preferenciális amplifikáció valószínűségét, ezzel csökkentve a PCR reakció specifikusságát, azonban mivel az illeszkedési hibák beiktatása megkerülhetetlen, a cél az univerzális komplementaritás és a specificitás közötti kompromisszum keresése.

A primer illeszkedési hibák jelentősen befolyásolják a multitemplát PCR kimenetelét és a PCR termék összetételének igen nagymértékű módosulását eredményezhetik. Egy primer illeszkedési hiba hatását több tényező együttesen határozza meg (illeszkedési hibák száma, típusa és elhelyezkedése [közbülső vagy széli (Ahn *et al.*, 2006)]):

- A *mismatch* hatására a primerrel tökéletesen illeszkedő templát preferenciálisan amplifikálódik a multitemplát PCR során (Ishii és Fukui, 2001; Sipos *et al.*, 2007).
- Az illeszkedési hibák hatásának legszembetűnőbb példája, hogy akár egyetlen 3' végi *mismatch* is sikertelen PCR reakcióhoz vezet (Ahn *et al.*, 2006).
- A *mismatch* pozíciója fontos tényező, mivel minél közelebb helyezkedik el az illeszkedési hiba a 3' véghez, annál nagyobb mértékben jelentkezik a preferenciális amplifikáció. Egyetlen illeszkedési hiba hatását vizsgálva Bru és mtsai (2008)

bizonyították, hogy a *mismatch* helyzetének jelentős hatása mellett további tényező, hogy az illeszkedési hiba melyik primeren helyezkedik el.

- Egy szekvencián belül az illeszkedési hibák száma negatív korrelációt mutat a PCR szaporítás hatékonyságával (Okano *et al.*, 2004; Teske és Sorensen, 2008).
- Az annelációs hőmérséklet csökkentésével bizonyos mértékben kompenzálni lehet a gyenge PCR amplifikációs hatékonyságot (Sipos *et al.*, 2007; Sekido *et al.*, 2008).

Bizonyos esetekben az illeszkedési hibákat szándékosan iktatják a primerek szekvenciáiba például egyes kis számban jelenlévő csoport specifikus kimutatásánál. A preferenciális amplifikáció tudatos és célzott alkalmazása bizonyos specifikus detektálások esetében csökkentheti a célcsoport kimutathatóságának határértékét. Ezt olyan esetekben érdemes kihasználni, amikor gyors, diagnosztikus felmérés, és az adott taxon jelenlétének vagy hiányának kimutatása a cél. Azonban a 16S rRNS gén alapú diverzitásvizsgálatok esetében az illeszkedési hibák megléte a közösség összetételéről nyerhető eredményeket súlyosan torzíthatja. Több módszer lehetséges az illeszkedési hibák kiküszöbölésére:

- A *mismatch* hatása kiküszöbölhető **degenerált pozíciók** alkalmazásával. Egy primer szekvencia degenerált, ha egyes nukleotid pozícióban különböző nukleotidokat tartalmaz. A gyakorlatban a degenerált primerek azonos mólarányban tartalmazzák az eltérő szekvenciájú primereket. A PCR primer hatékonyságát degenerált pozíciók beiktatásával növelni lehet, de a degeneráltság és preferenciális amplifikáció összefüggését modellközösségben vizsgálva azt tapasztalták, hogy a G-C kapcsolatot tartalmazó primer-célszekvencia illeszkedés az adott templát preferenciális amplifikációját eredményezheti az A-T illeszkedéssel szemben (Polz és Cavanaugh, 1998). Lueders és Friedrich (2003) 9 degenerált pozíciót tartalmazó *mcrA* primer esetében az annelációs hőmérséklet emelésével a közösségen belül bizonyos csoportok részarányának nagymértékű csökkenését figyelték meg. A túlzott mértékű „degeneráltság” nem-specifikus termékképződést eredményezhet. A DGGE ujjlenyomat mintázatokban a degenerált nukleotid pozíciók hozzájárulnak, hogy egy szekvencia több csíkban jelenjen meg, ezzel a valós bakteriális diverzitást túlbecsülve (Ahn *et al.*, 2006).
- Egy másik lehetőség a **dezoxi-nukleotid analógok** alkalmazása, ami nem jár a degeneráltság mértékének növelésével. A **dezoxi-inozin** analógok mind a négy nukleotid bázissal stabil kötést tudnak kialakítani (bár a kötések erőssége különböző mértékű). A **dezoxi-inozin** beiktatása *mismatch* pozíciókba javítja a PCR hatékonyságát és ezzel szélesebb diverzitás detektálását teszi lehetővé (Watanabe *et al.*, 2001).
- Egy további lehetőség, hogy a *mismatch* hatásokat kiküszöbölve realisabb képet kapjunk egy mikrobiális közösség összetételéről, hogy a PCR felszaporítást **több** – csak kis mértékben eltérő szekvenciájú – **primerrel párhuzamosan** végezzük el, és a PCR

termékeket csak ezután elegyítjük, és a továbbiakban, mint kompozit PCR minta dolgozzuk fel. Egy másik lehetőség, hogy végezhetjük mindezt egy reakcióterben, *multiplex* megoldásban (Frank *et al.*, 2008), azonban ez a megoldás is terhelt a degenerált pozíciók használatánál fellépő problémákkal.

Egy mikroba közösség PCR alapú diverzitás elemzéséhez, a primerek kiválasztásához első körben meg kell határozni a vizsgálni kívánt célszekvenciát, amely lehet fehérjé-t-kódoló, vagy strukturális gén (különböző mértékben mindkét esetben szolgáltathat filogenetikai információt is). Az elemezni kívánt célcsoport nagyságától függően választhatunk széles-, vagy szűkebb spektrumú primereket. Amennyiben a vizsgálatunk céljának és a PCR-t követő feldolgozási formának megfelelő, és már korábban leírt, létező primer alkalmazása mellett döntünk, mindenképpen tesztelni kell a primerek használhatóságát, még abban az esetben is, ha az irodalomban közölt adatok alapján a primer nagyon jó PCR hatékonyságról tesz tanúbizonyságot. A primerek hatékonyságának ellenőrzése történhet:

1. adatbázis szekvenciákkal szemben végzett mesterséges szimulációval (*in silico*):

Rengeteg szabadon hozzáférhető internetes program segíti a primer specificitás ellenőrzését. Az egyik legújabb platform a *Probe Check*, amellyel több adatbázis szekvenciái közül válogathatunk, az rRNS adatbázisok mellett (SILVA 16S/18S és 23S/28S) a „funkciógén” adatbázisokat is használhatjuk (FGPR: *Functional Gene Pipeline Repository*). A *Probe Check* sok beállítási lehetőséggel rendelkezik: az illeszkedési hibák maximálisan engedélyezett számát és típusát is figyelembe veszi (egyforma súllyal, vagy súlyozottan), és számos kísérleti körülmény is beállítható (pl. hibridizációs hőmérséklet), ami hibridizációs próbák illeszkedés vizsgálatánál nagyon hasznos funkció. A dolgozatban részletesen mégis a 16S rRNS génre épülő RDP adatbázis *Probe Match* programját használtuk, mert a vizsgált primerek illeszkedésének pontosságát a nagyobb taxonómiai csoportokra bontva értékeltük ki, amihez a *Probe Match* bizonyult hatékonyabbnak.

2. empirikusan: törzstenyészeteken, mesterségesen előállított mikroba közösségeken és környezeti mintákon egyaránt.

A kísérletes tesztelés legalább annyira fontos, mint az elméleti összehasonlítás. Tiszta törzsek esetében már 70%-os szekvencia azonosság is elégséges a sikeres PCR amplifikációhoz (Baker *et al.*, 2003), azonban ez egyáltalán nem garantálja azt, hogy a vizsgált fajt az adott primerrel a közösségi templátból sikeresen sokszorozítani tudjuk. Ennek legjobb bizonyítékát a dolgozatban részletesen elemzett 16S rRNS génre specifikus (a *Bacteria* doménre) 63F primer (Marchesi *et al.*, 1998) alkalmazása mutatja. A primer illeszkedését a rendelkezésre álló adatbázisok szekvenciáival ellenőrizték, és megállapították, hogy bizonyos csoportok esetében jelentős mennyiségű (akár 6-8) illeszkedési hiba mutatkozik. Azonban tiszta tenyészetek felhasználásával minden esetben kellő mennyiségű

PCR terméket sikerült ezzel a primerrel előállítani; továbbá nehezen amplifikálható környezeti minták esetében, más univerzális primerekhez képest a 63F jóval hatékonyabbnak bizonyult. Ezért nem feltételezték, hogy a primer erősen diverz templátok esetében súlyos differenciális amplifikációt eredményezhet. Kísérleteink ezt nem erősítették meg.

II.5.e Primer nomenklatúra

Mivel az irodalomban inkonzisztens a 16S rRNS gén-specifikus primerek elnevezése, az egyszerűség és a közérthetőség kedvéért dolgozatomban az általunk vizsgált 16S rRNS gén primerek leggyakrabban használt nevét tüntettem fel (6. táblázat, 10. ábra). Az eukarióta gomba 18S rRNS gén-specifikus PCR primerekre egységes nevezéktant hoztak létre (Gargas és DePriest, 1996), amely azonban a különböző primer variációkat nem fedi le. A tudományos folyóiratokban publikált cikkekben sajnos nem egységes a 16S rRNS gén primerek nomenklatúrája, pedig logikusan felépített nevezéktan létezik (Alm *et al.*, 1996). Így egyáltalán nem ritka, hogy ugyanahhoz a 16S rRNS gén nukleotid szekvenciához különböző primer elnevezéseket találunk, illetve gyakran ugyanaz a primer megjelölés egészen különböző szekvenciákat takar. Az általunk egyértelműen *Bacteria* domén-specifikus, EUB-968F primerként definiált oligonukleotidot rendszerint U968F-ként jelölik, ami persze utalhat arra is, hogy a *Bacteria* doménen belül minden egyes csoportra specifikus, tehát univerzális. Az „U” jelölés azonban általában mindkét doménre vonatkozik. A 338R primert, ami a *Bacteria* doménre specifikus, viszont általában helyesen EUB-338R-ként hivatkozzák. Tovább nehezíti a primer elnevezések és jelölések egységesítését, hogy az univerzális primerek szekvenciáit gyakran módosítják (pl. degenerált pozíciók, vagy nukleotid analóg inozin-trifoszfát beiktatásával), azonban ez a primerek jelölésében nem mindig mutatkozik meg, illetve előfordul, hogy figyelmetlenségből rosszul hivatkoznak a módosított primerre.

A zűrzavart jól szemlélteti a V3 régióra Muyzer és munkatársai által 1993-ban tervezett primerek hivatkozása (1. táblázat). A P2 *reverz* primernél kisebb a kavarodás, ugyanis egyetlen, a Muyzer által leírt nukleotid sorrenddel találkoztunk, azonban a primert kötőhelye *E. coli* pozíciója szerint mindkét végéről (az 5' illetve a 3' irányból) elnevezve hivatkozzák leginkább 534R, vagy gyakran 518R primerként. Ezt a primert a laboratóriumunkban éveken keresztül hibásan 519R néven használtuk, hiszen az 519R egy teljesen különálló, két degenerált nukleotid pozíciót tartalmazó primer (Larkin *et al.*, 2005). Egy esetben ugyanerre a primerre az 530R elnevezéssel is szembetalálkozunk (feltehetően gépelési hibáról lehet szó).

1. Táblázat. Muzyer és mtsai 1993-as cikkében leírt 16S DGGE rRNS génre specifikus primerekre történő irodalmi hivatkozások összehasonlítása néhány példán

Referencia	Forward primer elnevezés	hivatkozás	<i>E. coli</i> számozás	Forward primer nukleotid sorrend	Reverz primer elnevezés	hivatkozás	<i>E. coli</i> számozás	Reverz primer nukleotid sorrend
G. Muzyer <i>et al.</i> (1993)	P1 (P3)	Muzyer (1993)	5'	CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	P2	Muzyer (1993)	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	
Óvriás <i>et al.</i> (1997)	PRBA 338F		5'	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	PRUN 518R	+	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	
McCaig <i>et al.</i> (2001)	P3	+			P2	+		
Normander & Prosser (2000)	341F	+			534R	+		
Webster <i>et al.</i> (2003)	357F	+			518R	+		
Ellis <i>et al.</i> (2003)	341F	+	5'	CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	534R	+	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	
Temmerman <i>et al.</i> (2003)	357F	+	5'	T ACG GGA GGC AGC AG 3'	518R	+	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	
Ercolini (2004)	338F	+	5'	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	518R	+	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	
Dar <i>et al.</i> (2005)	341F	+	5'	CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	518R	+	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	
Nunan <i>et al.</i> (2006)	357F	+	5'		530R	+		
Stafford <i>et al.</i> (2006)	341F		5'	CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	534R		5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	
Klammer <i>et al.</i> (2008)	338F	+	5'	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	518R	+	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	
de Araujo & Schneider (2008)	338F	+			518R			
Wang <i>et al.</i> (2008)	341F	+	5'	CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	534R	+	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	

A Muzyer és mtsai (1993) által említett primerek közül P1 a forward primer, P2 a reverz primer illetve P3 a P1 primer GC-kapcsolos verziója. Ahol az adott cikkben közölt primer kapcsán Muzyer említett cikkre hivatkoznak azt + jellel láttuk el. Nem jelöltük a táblázatban említett tudományos közleményekben felhasználott primerek nukleotid sorrendjét ott, ahol ezt a szerzők sem tették meg.

A **forward** primernél még ennél is bonyolultabb a helyzet, hiszen amint az a táblázatból is kitűnik, itt két szekvencia használata és a primer elnevezések is jócskán keverednek (Nunan *et al.*, 2006). Valójában a Muyzer által közölt forward **P1** primer az *E. coli* 16S rDNS 341-357 pozíciók közötti szakaszra tervezett primer, és létezik egy ezzel átfedő szakaszra illeszkedő 338F primer is (Larkin *et al.*, 2005), de ezek a hivatkozások a Muyzer *et al.* (1993) DGGE primerekkel nem konzekvensen történnek. Hasonló kuszasághoz vezetne a 968F-1401R primerpár hivatkozásainak összevetése is. Ebben az esetben két nagyon hasonló **forward** primer szekvencia használata keveredik (Nübel *et al.*, 1996; Felske *et al.*, 1997), illetve az 1401R primernek is két variációja létezik [1401R: (Nübel *et al.*, 1996); és a később L1401R primerként hivatkozott: (Heuer *et al.*, 1997)].

A publikációkban van, aki a 3' vég szerint, van, aki az 5' vég szerint nevezi el a primereket; és van, aki a célszekvencia *E. coli* számozása alapján teszi mindezt. Ha nem is sikerül rövid időn belül egységesíteni az univerzális 16S rRNS gén-specifikus primerek elnevezését, mindenféleképpen elengedhetetlennek tartom, hogy a közleményekben minden esetben az alkalmazott primerek pontos nukleotid sorrendjét feltüntessék, mivel – ahogyan ez a mi laborgyakorlatunkban is megesett – egy elírt szám egészen nagy kavarodást okozhat.

Gyakran megtörténik, hogy vissza kell nyúlni a gyökerekhez; én ebből a célból ismertetem az Alm és mtsai (1996) által megalkotott egységes rRNS oligonukleotid próba nomenklatúrát, amelyet az Anyag és módszer fejezetben az általunk használt primerekre is alkalmaztam. Valószínűleg a rendszer egyesek számára túl bonyolult, ráadásul a különböző primer variációk meghatározásában (lásd 5. pont) pontos nemzetközi definiálást igényel, ezért hamar megfeledeztek róla. A fentebb ismertett kuszaságok azonban azt igazolják, hogy érdemes lenne feleleveníteni és egységesen alkalmazni ezt a rendszert.

Az OPD-t (*Oligonucleotide Probe Database*) Alm és mtsai (1996) hozták létre, és az RDP integrált részeként működött. Ma a *probeBase* (Loy *et al.*, 2007) is alkalmazza, de tudományos közleményekben csak elvétve használják (el Fantroussi *et al.*, 1997; Loy *et al.*, 2004). Minden oligonukleotid próbához egy **7-tagból álló elnevezést** társít, ami a korábbi nevezéktanhoz képest abban nyújtott újat, hogy ezáltal ugyanannak a primernek (specifititás, *E. coli* pozíció, hossz) a különböző variációi, módosításai is megkülönböztethetőek lettek. A 7 tulajdonság kötőjellel különül el egymástól. A nevezéktant az egyik legáltalánosabb rRNS oligonukleotidon (általunk 338R-ként használt primer, (Amann *et al.*, 1990) ismertetem:

1. Célszekvencia kódja („S”-*small subunit* rRNA, „L” *large subunit* rRNA) pl. S-
2. A **legmagasabb/legnagyobb taxonómiai csoport** amit a próba elhatárol („K”-*kingdom*; „D”-*domain*; „P”-*phylum*; „O”-*order*; „C”-*class*; „F”-*family*; „G”-*genus*; „S”-*species*, „Ss”-*subspecies*). Univerzális próbáknál, vagy ami nem reprezentál egy koherens taxonómiai csoportot, ott a * jelet használják. pl. **S-D-**
3. Az adott specifikus génklaszter, géncsalád, taxonómiai vagy filogenetikai csoport rövid megnevezése (3-5 betű) („*Prok*”-*Bacteria* és *Archaea* domének; „*Bact*”- *Bacteria* domén) pl. **S-D-Bact-**
4. A próba 5’ pozícióját a nukleinsav *sense*/kódoló szálán jelző szám, ami azonos a *sense*/kódoló próba/primer (forward) 5’ végével, illetve ami az *antisense*/nem-kódoló próba/primer (reverz) 3’ végével komplementer. A szám annyi helyértékből áll, amilyen hosszú a teljes gén (16S esetében kb. 1540 bp, tehát 4 számból álló kód, *E. coli* számozás szerint). pl. **S-D-Bact-0338-**
5. a próba/primer „verzióját” jelölő betű („a”-eredeti verzió; „b”-második verzió, ami csak nukleotid sorrendben különbözik „a”-tól, a többi paraméterben megegyeznek pl. **S-D-Bact-0338-a**
6. Nagybetű jelzi, hogy a próba/primer a DNS kódoló/nem-templát szálával („S”) vagy a templát/*antisense* szálal azonos („A”) pl. **S-D-Bact-0338-a-A**
7. a próba/primer nukleotid bázisban kifejezett hossza pl. **S-D-Bact-0338-a-A-18**

Nagyon fontos, hogy minden esetben a primerek **pontos nukleotid sorrendjét is megadjuk**, és a primerek különböző verzióit betűkódokkal minden kétséget kizáróan definiáljuk. Mindenképpen fontos lenne, ha a tudományos közleményekben az egyes folyóiratok bírálói csak a megfelelően definiált riboszómális oligonukleotid primer/próba verziókkal ellátott hivatkozásokat fogadnák el.

II.6 PCR körülmények hatása

II.6.a PCR hőmérséklet profilok

A PCR reakciók általános hőprofilja közismert (3. ábra), ebben a fejezetben azokat a tényezőket ismertetem, amelyek befolyásolhatják a PCR során fellépő differenciális amplifikációt, és az ebből eredő torzításokat/ arányomódosulások mértékét tovább fokozhatják.

A **kezdeti denaturáció** általában egy 92-95°C hőmérséklet tartományban alkalmazott 2-5 perces inkubációt jelent, amely biztosítja a DNS szálak teljes szeparációját. A „*hot start*” PCR protokollok viszonylag nagy hőmérsékletű (95°C), és hosszabb ideig tartó kezdeti denaturációs lépéssel indulnak. Ezt alkalmazzák, amikor a reakcióban templátként a teljes

genomiális DNS szerepel, és abban az esetben, amikor a mikroba közösség összetétele nem ismert, hiszen a templátok között szerepelhetnek igen nagy G+C aránnyal rendelkező fajok, amelyek DNS-ének teljes denaturálása magas hőmérsékletet igényel. Kisebb hőmérsékletű és rövidebb kezdeti denaturáció használható ismerten alacsony G+C tartalmú mintáknál és „*nested*” PCR esetén (lásd II.6.b.1 fejezet). Ha nem olyan módosított polimerázokat alkalmazunk, amelyek jól bírják a „*hot start*” lépést (lásd II.7 fejezet), akkor az enzimet utólag kell a reakcióhoz hozzáadni, hogy aktivitása a nagy hőmérsékletű inkubáció alatt ne csökkenjen, illetve, hogy elkerüljük a kezdeti denaturációt megelőző, a primerek olvadási hőmérsékleténél jóval kisebb hőmérsékleten esetlegesen fellépő nem-specifikus amplifikációt és „primer-dimer” képződést (Chou *et al.*, 1992).

A PCR specificitás kulcsa a primerek kötődésének pontossága és hatékonysága, amit alapvetően az **annelációs hőmérséklet** határoz meg. Optimális esetben a PCR-nél használt primerek olvadási hőmérsékleténél (T_m) általában 5°C-kal kisebb annelációs hőmérsékletet alkalmaznak. A túl kis hőmérséklet aspecifikus primer hibridizációt és ezzel nem kívánt PCR termékeket eredményezhet; a túlságosan nagy annelációs hőmérséklet viszont kevés specifikus PCR termék keletkezésével jár, esetleg egyáltalán nem képződik a kívánt termék. A PCR hatékonysága növelhető a Mg^{2+} koncentráció emelésével és különböző adalékanyagokkal (Devereux és Wilkinson, 2004), mégis a PCR hozam és specifikusság érdekében legegyszerűbben az annelációs hőmérsékletet lehet változtatni.

II.6.a.1 *Touch down PCR*

A PCR exponenciális jellegét felhasználva, az aspecifikus termékek (*mispriming*) képződésének kiküszöbölésére gyakran az ún. *touch down* protokollokat/hőprofilokat javasolják (Don *et al.*, 1991). A kezdeti PCR ciklusok során alkalmazott nagyobb hőmérsékleten specifikus primer-templát hibridek alakulnak ki és ezzel specifikus termékek keletkeznek. A további ciklusokban használt fokozatosan csökkentett hőmérsékleteken (0,5-1,05°C/ciklus) már a kezdeti lépések során sokszorosított PCR termék fog nagyobb hatékonysággal amplifikálódni. A legkisebb, *touch down* hőmérsékleten lezajló ciklusok fejezik be a PCR-t. A mikrobiális ökológiában rutinszerűen használnak *touch down* protokollokat, mert a specifikus termék dominanciája a további *downstream* alkalmazások sikerének záloga. A DGGE módszer első környezeti mikrobiológiai alkalmazását Muyzer és mtsai (1993) írták le, amelyre tudományos közleményekben a legfrissebb adatok szerint már 2 790-szer hivatkoztak (2009. október). A szerzők *touch down* PCR protokollt használtak törzsekre és élőbevonatokból kivont közösségi genomi DNS mintákra, amelyek DGGE

mintázatait elemezték. Ez a cikk vált a DGGE elemzések mintájává, ezzel hozzájárulva a *touch down* hőprofilok rutinszerű alkalmazásához.

Azonban azóta bebizonyosodott, hogy nagyobb annelációs hőmérsékleteken a PCR során fellépő preferenciális amplifikáció jóval erőteljesebben jelentkezik, és csökkenti a közösségi DGGE mintázatok komplexitását (Ishii és Fukui, 2001; Hongoh *et al.*, 2003). Ennek ellenére a *touch down* protokollok használata továbbra is bevett gyakorlat. Li és mtsai (2009) például 8 különböző 16S rRNS génre specifikus univerzális primerpárt használtak, mindegyik esetben *touch down* protokollal. Vizsgálatuk tárgyát PAH (policiklikus aromás szénhidrogének) szennyezett talajok képezték, és feltételezhető, hogy a szennyezőanyagok gátló hatása miatt kényszerültek minden primer esetében *touch down* hőprofilokat használni, azonban ez mindenképpen befolyásolja a mikroba közösségről nyerhető diverzitást.

A **láncosszabítási lépés** hőmérsékletét alapvetően az alkalmazott DNS polimeráz enzim hőmérséklet optimuma határozza meg, míg az extenzió hosszát az enzim típusa mellett a PCR termék hossza is befolyásolja. A legáltalánosabban használt *Taq*³ polimeráz enzimműködésének optimuma 72°C, és <2 kb hosszú termékek esetében az egyperces extenzió elégséges. Az extenzió időtartama növelhető, mivel mesterséges közösség vizsgálatánál leírták, hogy az extenzió hosszának 20 mp-ről 4 percre növelése jelentős mértékben csökkentette a PCR során keletkező kiméra műtermékek számát (Qiu *et al.*, 2001).

A PCR ciklusok legvégén egy 5-15 perces végső extenziót alkalmaznak, melynek célja, hogy a nem teljes szálú amplikonok egész hosszukban kiegészüljenek. A végső láncosszabítási lépés hosszát leginkább a PCR-t követő alkalmazások határozzák meg:

- DGGE elemzéseknél egy 30 perces extenzióval sikeresen kiküszöbölték a konzekvensen dupla csíkokat megjelenését (Janse *et al.*, 2004)
- TA-klónozáshoz az alkalmazott klónozó vektortól függően szintén hosszabb extenziót ajánlott használni (7-30 perc), a teljes hosszúságú és 3'-végi adenin nukleotid beépülésének biztosítása érdekében

II.6.b PCR ciklusszám

A PCR termékek mennyisége az alkalmazott ciklusok számával exponenciálisan nő. A minél nagyobb mennyiségben előállított PCR termék érdekében elméletileg érdemes minél nagyobb ciklusszámot használni, azonban nem ajánlott a ciklusszámot a végtelenségig növelni. Ismert a PCR reakciók telítési görbéje, mely szerint a reakció kezdeti fázisában exponenciális, majd kvázi-lineáris, és ezt követően éri el a „platót”, amikor az amplikonok

³ A *Taq* nukleotid beépítési sebessége 60 nukleotid másodpercenként 70°C-on.

képződésének sebessége nem nő tovább (Kainz, 2000). A plató effektushoz számos tényező járul hozzá:

- a reakció komponenseinek kimerülése (primerek, nukleotidok, DNS polimeráz)
- az enzimaktivitás csökkenése (termális inaktiválódás)
- enzimaktivitás gátlása a növekvő pirofoszfát koncentrációval
- denaturáció hatékonyságának csökkenése
- célszekvenciának megfelelő ampikonok re-annelációjának gátló hatása ($>10^{-8}\text{M}$)
- a termékek tönkretétele az enzim $5' \rightarrow 3'$ exonukleáz aktivitása által.

Ezen tényezők közül a termékek gátló hatását tekintették a legjelentősebbnek, amely a „plató effektushoz” hozzájárul. A 10^{-8}M PCR termékkoncentráció felett az exponenciális fázist a plató váltja fel. Ebből a számításból általában a 30 ciklus alkalmazása elegendőnek bizonyult. A feleslegesen sok PCR ciklus alkalmazása időpazarlást jelent, és egyes esetekben hatása lehet a PCR során fellépő differenciális amplifikációra. A preferenciális amplifikációért a primer-kötődési energiák különbözőségét (Polz és Cavanaugh, 1998; Ishii és Fukui, 2001), és a PCR termékek gátló hatását (Suzuki és Giovannoni, 1996) tették elsődlegesen felelőssé. Igaz ugyan, hogy az illeszkedési hibából adódó kötési energia különbsége igen jelentős hatással bír az amplifikáció hatékonyságára, azonban a ciklusok előrehaladtával ez a hatás mérséklődik, hiszen ekkor az amplifikáció nagyrészt már a PCR termékekről történik, amelyek már tökéletesen illeszkednek a primerekkel. Továbbá a re-annelációs gátlás mértékéről – amely a ciklusszám csökkentésével jelentősen mérsékelhető – szintén bebizonyosodott, hogy hatása nagy ciklusoknál különböző molekuláris „ujjlenyomat” technikák alkalmazásával sem mutatható ki diverz környezeti minták elemzésekor [ARISA (Fisher és Triplett, 1999); T-RFLP (Lueders és Friedrich, 2003)].

II.6.b.1 A multitemplát PCR során keletkező melléktermékek

Túl sok PCR ciklus alkalmazása nem javasolt, mivel a multitemplát PCR során keletkező melléktermékek mennyisége egyértelmű pozitív korrelációt mutat a ciklusszámmal (Qiu *et al.*, 2001). A melléktermékek között kimérák, heteroduplexek, és a polimeráz enzimek hibájából eredő mutációk szerepelnek.

A multitemplát PCR során a **heteroduplexek** kereszt-hibridizációval jöhetnek létre, mivel a heterológ termékek mindkét végén homológ szekvenciák találhatók (primer kötő helyek), amelyeken keresztül kialakulhat a heteroduplex molekula. A heteroduplexek jelenléte komoly problémát okoz a PCR alapú molekuláris „ujjlenyomat” módszerek ampikon elválasztása, és a molekuláris klónozás során. Ugyanis a heteroduplex molekulák eltérő elektroforetikus mobilitása extra csíkokat eredményez (DGGE), és ezáltal nem létező

diverzitást jelez. Restriktációs emésztésen alapuló módszerek esetében (RFLP, T-RFLP) pedig azt okozhatják, hogy egyes amplikonok egy enzimmel szemben „elveszítik” restriktációs hasító helyüket, és ezért a közösségi mintázatban emésztetlen fragmentumként jelentkeznek. Klónozás során a gazdaszervezet *mismatch* hibajavító rendszere random módon választ a két szál közül a javítani kívánt nukleotid pozícióban. Ennek eredményeként létrejöhet a két heterológ szál keveréke, ami mesterségesen generált, többlet diverzitást okoz. Mivel a heteroduplexek kialakulásának valószínűsége a primerek koncentrációjának csökkenése, és a termék molekulák koncentrációjának növekedésével szignifikánsan nő, ezért kiküszöbölésükre érdemes alacsony ciklusszámot alkalmazni, illetve számuk csökkenthető „újra-kondicionálással”, mely során kis PCR ciklus után a kihígított PCR terméket újabb, pár ciklusú PCR-nek vetik alá, amelyben a primer koncentrációja újból inkább a primer-templát hibrid kialakulásának kedvez (Kanagawa, 2003).

Kimérák („*shuffle genes*”) – amely molekulák két különböző szekvenciából tevődnek össze – létrejöhetnek nem teljesen meghosszabbított primerekből, amelyek a soron következő ciklus alatt maguk primerként viselkedhetnek, és egy másik, részlegesen homológ templáthoz kötődve kimérát képezhetnek. Egy másik lehetséges mechanizmus szerint kimérák a polimeráz enzim láncosszabbitsa közben „templát-váltással” is kialakulhatnak (Kanagawa, 2003). Töredezett, fragmentálódott DNS templát használatával a kimérák képződésének gyakorisága jelentősen megnő; azonban a ciklusszám csökkentésével és a láncosszabbitsó lépés hosszának növelésével a kimérák száma csökkenthető (Qiu *et al.*, 2001). Számos program segíti a kiméra gyanús szekvenciák kiszűrését [CHIMERA_CHECK (Maidak *et al.*, 2000); PINTAIL (Ashelford *et al.*, 2005); MALLARD (Ashelford *et al.*, 2006)]. Ezt az ellenőrzést feltétlenül végezzük el a szekvenciák publikus adatbázisokba történő elhelyezése előtt.

A PCR során alkalmazott polimeráz által beépített hibás nukleotidok, mutációt okoznak és szintén PCR-generált melléktermékek. Az polimeráz enzimek hibázási gyakorisága enzimenként eltérő; Cline és mtsai (1996) eredményei alapján az egy nukleotidra jutó mutációs gyakoriság $1,3 \times 10^{-6}$ – 5×10^{-5} közötti tartományban változik, de a hibajavító funkcióval bíró (*proofreading*) enzimeknél jóval ritkább. A PCR melléktermékek minimalizálása céljából érdemes a ciklusszámot alacsonyan tartani, és inkább párhuzamos PCR reakciók termékét egyesíteni a kívánt hozam eléréséhez (Qiu *et al.*, 2001).

II.6.b.2 „Nested” PCR

A *nested* vagy „dupla” PCR-es protokollok két, egymást követő PCR reakcióból állnak, amelyben ugyanannak a génnek a szaporításához különböző primerpárokat használnak. Az első PCR lépésben egy általános reakció megy végbe egy ún. külső primerpárral. Második lépésben templátként már az első reakció PCR terméke szolgál, és a második ún. belső

primerpár az első PCR cél-génszakaszán belül hibridizál, ezáltal egy rövidebb termék keletkezik. Ritka esetben három lépcsős *nested* megoldásokkal is találkozhatunk, amikor egy bizonyos csoport specifikus kimutatásához megfelelő mennyiségű és minőségű PCR termékre van szükségünk (pl. SRB vizsgálata DGGE-vel; (Dar *et al.*, 2005). A *nested* PCR reakciók egyik válfaja a *seminested* PCR, amely az általános felépítéstől annyiban különbözik, hogy a második lépésben a külső primerpár egyik primere egy harmadik primerrel együtt végzi a kívánt génszakasz szaporítását. A külső és belső primerpárok specifikitása megegyezhet egymással (Nikolausz *et al.*, 2005) de különbözhetnek is. Amennyiben a két primerpár specifikitása eltér, kétféle stratégia áll rendelkezésre: lehetséges első körben egy általános, univerzális primert alkalmazni és másodszorra egy szűkebb, csoport specifikus primert; vagy ellenkezőleg első körben a taxon-specifikus, majd az univerzális primerpárt használni (DeJournett *et al.*, 2007). A *nested* stratégia előnyös megoldást nyújt a következő problémás helyzetekre:

- A *nested* megoldással a PCR specifikussága növelhető, mivel kicsi az esélye annak, hogy az első körben keletkezett aspecifikus termék (*mispriming*) a második lépésben, egy másik primerpárral is hatékonyan amplifikálódjon.
- A *nested* PCR-rel a különböző csoport-kimutatások érzékenysége növelhető, hiszen a PCR hozama nagyobb, és ezáltal a kis mennyiségben jelenlévő taxonok kimutatása is valószínűbb. Ebben szerepet játszhat, hogy a *nested* lépéssel a kiindulási DNS mintában esetleg jelenlévő PCR gátló anyagok hígulnak (Dar *et al.*, 2005), illetve már az első körben megfelelő mennyiségű templát keletkezik a második PCR reakció számára.
- Fontos szempont a különböző molekuláris „ujjlenyomat” technikák alkalmazásakor, hogy a különböző mikroba csoportokat külön is vizsgáljuk, mindemellett egy DGGE/TGGE futással elemezhetjük. Erre ad lehetőséget, ha az első körben taxon-specifikus primerpárt használunk, és csak a második körben alkalmazzuk az univerzális, GC-kapcsos primerpárt. Ezáltal a minták egy gélen belül együtt vizsgálhatóak, mivel ugyanolyan hosszúságú fragmentumokról van szó, és minden csoportra ugyanazokat a DGGE futási paramétereket állíthatjuk be (Boon *et al.*, 2002).

A mikroba közösség diverzitásáról nyerhető képzet azonban éppen a dupla PCR-rel torzíthatjuk súlyosan, ha nem megfelelően tervezzük a reakciónkat; hiszen az első lépés hibái a következő PCR-re szállnak. A *nested* PCR lépésből adódó PCR hibák jelentőségének mértékét vitatják, ugyanis többen csak kismértékű eltérést tapasztaltak *nested* PCR molekuláris „ujjlenyomat” mintázatokban a csíkok erősségében, ami a „domináns” csoportokat nem érintette (Boon *et al.*, 2002; Dar *et al.*, 2005; Nikolausz *et al.*, 2005).

Összességben elmondható, hogy a *nested* stratégia jó választás, amennyiben a cél kis abundanciájú csoportok kimutatása; illetve ha a további, PCR-t követő feldolgozás nagyobb mennyiségű terméket feltételez, amit direkt, egylépéses PCR-rel nem tudunk előállítani.

II.7 DNS polimeráz enzim különbségek

A PCR-rel történő sokszorozásért a DNS polimeráz enzim felelős, amely az anneláció során kialakult primer-templát hibridhez kapcsolódva a szabad nukleotidokat a lánchosszabbítási lépésben építi be az újonnan szintetizálódó DNS szálba. Az enzim megfelelő működéséhez puffertelt közegre, és a reakciótérben megfelelő koncentrációban jelenlévő Mg^{2+} ionokra (0,5-5 mM) és nukleotid bázisokra (20-200 μM) van szükség. A PCR alapvető célja, hogy a templát DNS sokszorozása megbízhatóan, a lehető legrövidebb idő alatt és a lehető legnagyobb mennyiségben történjen meg. A legáltalánosabb PCR amplifikációhoz *Taq* (*Thermus aquaticus*-ból származó) DNS polimeráz enzimet használnak, amely 5'→3' exonukleáz aktivitással rendelkezik. Azonban számos olyan hőstabil DNS polimeráz enzim is ismert, amely 3'→5' exonukleáz aktivitással, azaz hibajavító funkcióval bír (*Pfu*, *Tfi*, *Pwo*, *Vent*), és amelyek ezáltal jóval kisebb valószínűséggel építenek be hibás nukleotidokat a DNS láncba. Klónozáshoz, mutáció analízishez és *Long-Range PCR* alkalmazásokhoz megbízható, *proofreading* polimeráz enzimekre van szükség. A PCR hatékonyságának növelése érdekében olyan enzimkeverékeket állítanak elő, amelyben hibajavító funkcióval rendelkező illetve nem rendelkező polimerázokat elegyítenek. Bizonyítást nyert, hogy már igen kis mennyiségben jelenlévő *proofreading* enzim is jelentősen javítja pl. a *Taq* polimeráz enzim teljesítményét (Cline *et al.*, 1996).

Igen nagy a PCR-hez használható polimeráz enzimek választéka, ugyanis a különböző enzimeknek „hot-start” változatai is léteznek, amelyek a kezdeti nagy hőmérsékletű, hosszabb denaturációt is „kibírják”, ezért utólagos bemérésük a reakcióelegybe nem szükséges (HotStar *Taq*, HotMaster*Taq*, *Pfu Turbo* Hotstart). Számos kutatási eredmény számolt be arról, hogy a PCR hatékonyságot nagyban befolyásolja a reakcióban alkalmazott polimeráz enzim típusa (Tyler *et al.*, 1997; Abu Al-Soud és Radstrom, 1998; Arezi *et al.*, 2003).

A kísérletünk számára legmegfelelőbb polimeráz enzim kiválasztásakor figyelembe kell venni a PCR termék további felhasználásának módját, és mérlegelni kell a PCR hatékonyság enzim függőségének jelentőségét. Ismertetek néhány olyan kísérleti körülményt, amikor kiemelten fontos a polimeráz enzim megválasztása:

- Klónozáshoz és *Long-Range PCR* alkalmazásokhoz megbízható, *proofreading* polimeráz enzimekre, vagy keverék formulákra van szükség. A hőstabil polimerázok replikációs hatékonyságukban különböznek, és hibázási arányukat befolyásoló tényező a pufferközeg összetétele és pH-ja (Cline *et al.*, 1996).

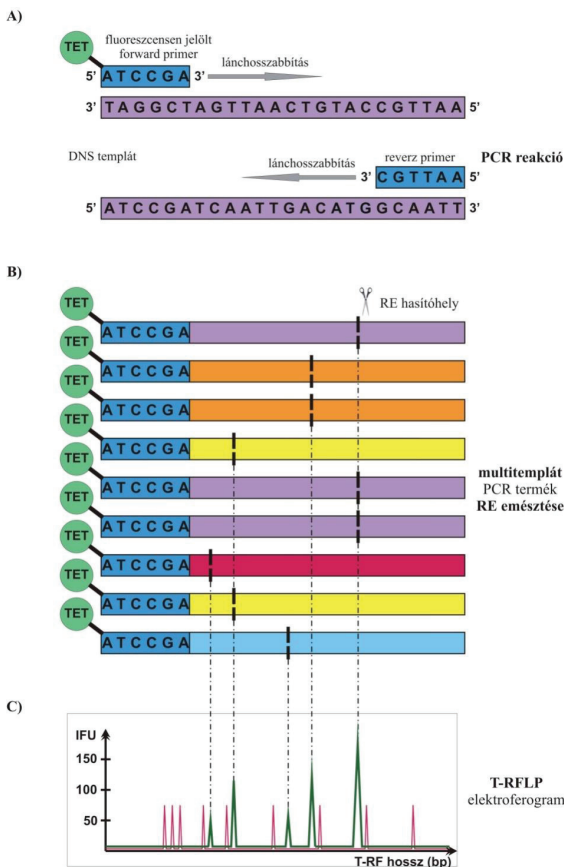
- A polimeráz enzimek különbözőségének hatása a PCR hatékonyságára hosszú amplikonok (>1-2 kb) és/vagy nagy G+C arányú célszekvenciák sokszorosításánál igen jelentős különbségeket eredményezhet; míg ugyanez a hatás a normál hosszúságú és kis G+C tartalmú amplikonok esetében nem annyira jelentős (Arezi *et al.*, 2003).
- A polimeráz enzimeket a környezeti mintában eredetileg meglévő, vagy a DNS preparáció során a mintába került szennyezőanyagok gátolhatják. Talajminták esetében a PCR sikertelenség gyakori okozója a huminsavak jelenléte, a gátló hatás mértéke pedig erősen összefügg a PCR-nél alkalmazott polimeráz típusával (Tebbe és Vahjen, 1993). Hasonló enzim típus-függő gátló hatást mutattak ki különböző fémionokat tartalmazó, illetve vért és fekáliát tartalmazó környezeti minták PCR amplifikációja során (Abu Al-Soud és Radstrom, 1998).

Nem minden esetben van módunk a polimeráz enzim célzott megválasztására, mivel gyakran ismeretlen összetételű környezeti mintákkal kell dolgozni. Arra azonban minden esetben nagy hangsúlyt kell fektetni, hogy a vizsgálatokhoz mindvégig standardizált körülményeket, ugyanazt a polimeráz enzimet használjunk (esetleg több szállítmányból egy nagy készletet létrehozva), és a PCR reakciókat egy berendezésen végezzük, hogy a kutatócsoport eredményei összevethetőek legyenek.

II.8 T-RFLP molekuláris „ujlenyomat” módszer

A T-RFLP módszer (terminális restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus) hasonlóan az ARDRA-hoz, a restrikciós enzimekkel emésztett PCR termék méret szerint szétválasztásán alapszik. A PCR reakció során a templát szaporítása azonban speciális, 5' végen fluoreszcensen jelölt primerrel történik, így egyik végükön jelölt PCR termékek jönnek létre. A restrikciós hasító helyek száma és elhelyezkedése miatt a PCR termékek restrikciós endonukleázokkal végzett emésztése más-más terminálisan jelölt fragmentumot eredményez (Liu *et al.*, 1997). Az emésztett amplikonok elválasztása többnyire nagy hatékonyságú kapilláris gélelektroforézissel történik, viszont csak a fluoreszcensen jelölt terminális fragmentumokat detektáljuk (4. ábra). A mintával együtt futtatott, eltérő fluoreszcens jelöléssel ellátott belső molekulásúly standard, a relatíve rövid szakaszok és hasonló bázisösszetétel miatt nagyon pontos fragmentumhossz meghatározást tesz lehetővé. Mivel a belső standard a kísérleti mintával együtt kerül a kapillárisra, azonos elektroforetikus erők hatnak rájuk, így nem kell külön kompenzálni az injektálások közti eltérésekért. A vizsgált mintánál a primerek kötési helye illetve a restrikciós enzimek hasítási helyeinek ismeretében adott taxonhoz T-RF (terminális restrikciós fragmentum) hosszak adhatóak meg. A T-RF hosszak alapján a csúcsokhoz filogenetikai információ rendelhető, a görbe alatti területekből

pedig a mennyiségi viszonyokra következtethetünk. A T-RF-ek detektálásával nyert kromatogramokon jól látható, hogy a diszkrét csúcsok elhelyezkedése a terminális fragmentum hosszától, a görbe alatti terület a T-RF kópiaszámától függ (4. ábra).



4. ábra. A T-RFLP technika sematikus vázlata.

A) A PCR során speciális 5' végén fluoreszcens festékkel jelölt (TET) primerrel, vagy primerekkel (multiplex T-RFLP) történik a DNS templát szaporítása. B) A multitemplát PCR termék emésztését egyedi szekvencia szakaszt felismerő restrikciós endonukleázzal végezzük. C) Kapilláris gélelektroforézis (CGE) segítségével, méret alapján választjuk el az 5' végén fluoreszcensen jelölt amplikonokat (terminális restrikciós fragmentumokat, T-RF) és ezeket lézergérsztésű fluoreszcens jelek alapján CCD kamerával detektáljuk. Az elektroferogramon pirossal jelölt csúcsok a mintával együtt futó TAMRA-500 belső méret standard fragmentumai, a zölddel jelölt csúcsok a multitemplát PCR amplikonjainak csúcsai.

A T-RFLP módszer az utóbbi évtized legkedveltebb molekuláris „ujjlenyomat” technikájává vált. Népszerűségét annak köszönheti, hogy a nem kapilláris gélelektroforézisen

(DGGE) alapuló elválasztási technikáknál nagyobb felbontóképességről tett tanúbizonyságot (Moeseneder *et al.*, 1999; Girvan *et al.*, 2003; Nunan *et al.*, 2005), és az elválasztott T-RF fragmentumok hossza és relatív jelintenzitása kiválóan reprodukálható, ezáltal a módszer lehetővé teszi, hogy a mikroba közösséget alkotó taxonok egymáshoz viszonyított arányaira is következtethessünk (szemi-kvantitatív módszer). A módszer további előnye, hogy nem kell korrigálni a mennyiségi adatokat a fragmentumhossztól függően, mivel a fluoreszcens jel intenzitása kópiaszám függő, míg a teljes DNS lánc festése esetén (etidium-bromid, vagy SYBR green) az intenzitás amplikonhossz függését is kalkulálni kellene.

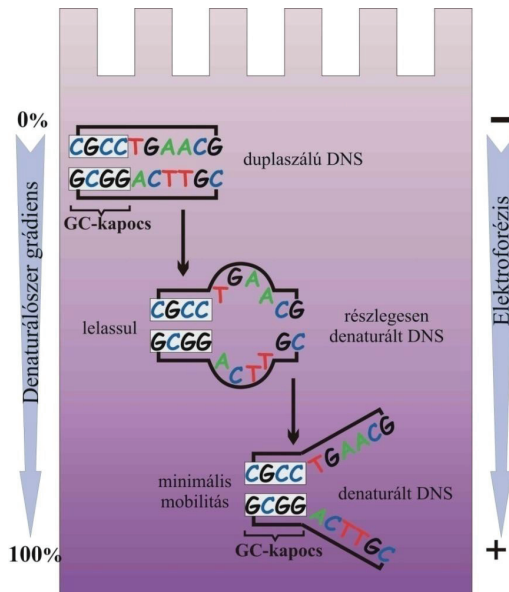
A technika korlátai közé tartozik, hogy a filospecieszek direkt azonosítása nem lehetséges. A T-RF hosszak alapján és közvetett, számítógépes szimulációs hasításon alapuló (*in silico*) identifikáció a 16S rRNS gén vizsgálatok esetén nem állapítható meg nagy biztonsággal, így az egészen pontos azonosítás pl. klónkönyvtár elkészítését igényli (Székely *et al.*, 2009). További problémát jelentenek az ún. pszeudo-T-RF-ek, azaz olyan terminális fragmentum műtermékek, amelyek a különböző T-RFLP „ujjlenyomat” mintázatokban a valódi terminális fragmentumok csúcsainak közelében jelennek meg. A pszeudo-T-RF-ek kialakulásának hátterében egyszálú DNS képződése (Egert és Friedrich, 2003), és a PCR során használt polimeráz enzim fennmaradó aktivitása áll (Hartmann *et al.*, 2007). A mikrobiális ökológiában a T-RFLP módszer a mikroba közösségek hihetetlenül gyors feltérképezésére ad lehetőséget és kiválóan alkalmas a közösségszerkezetben bekövetkező relatív mennyiségi változások precíz és megbízható követésére (Hartmann és Widmer, 2008).

II.9 DGGE molekuláris „ujjlenyomat” módszer

A DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis) egy vertikális PAGE-re (poliakrilamid gélelektroforézis) alapuló szeparációs módszer, amely alkalmas azonos hosszúságú, de eltérő szekvenciájú amplikonok egyetlen bázisnyi különbségének kimutatására, ezáltal alkalmas pontmutációk vizsgálatára. Formamid és urea denaturálószerrek lineáris gradiensét tartalmazó poliakrilamid (PAA) gélben a duplaszálú DNS (dsDNS) szakaszok növekvő koncentrációjú denaturáló közegben vándorolnak. A függőleges állású PAA gélben a denaturálószer koncentrációja felülről lefelé nő, iránya megegyezik az elektroforézis vertikális irányával.

A DGGE-hez használt templát DNS-t PCR segítségével, speciális primerekkel szaporítjuk fel. A primerek egyike az 5' végén egy 30-50 bázispár hosszúságú úgynevezett GC-gazdag régiót, „GC-kapcsot” (*GC-clamp*) tartalmaz, amely csak guanin és citozin nukleotid bázisokból épül fel, és a PCR során a templáttal együtt amplifikálódik (Muyzer és Smalla, 1998). Az elektroforézis során a duplaszálú DNS molekulák fokozatosan széttekernednek a denaturáló közegben, amelyet az állandó magas hőmérséklet (50-65°C

között) illetve az urea és formamid denaturálószerrek lineáris gradiensek együttes kombinációja alakítja ki (5. ábra).



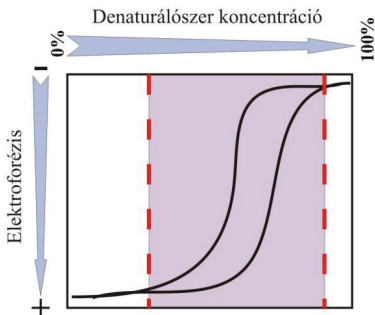
5. ábra. A DGGE technika sematikus vázlata.

A DGGE vertikális PAA (poliakrilamid) gélelektroforézisre alapuló szeparációs módszer. A duplaszálú DNS szakaszok formamid és urea denaturálószerrek lineáris gradiensét tartalmazó PAA gélben, nagy hőmérsékleten (ca. 60°C-on) a növekvő koncentrációjú denaturáló közegben vándorolnak. Az egyes DNS fragmentumok szekvenciájuk által meghatározott „olvadásponton” a DNS szakaszok denaturálódnak, széttekerednek, mobilitásuk jelentősen lecsökken, ezáltal vándorlási sebességük is; a széttekeredő DNS szálakat a GC-kapocs azonban összetartja.

A GC gazdag régió az elektroforetikus elválasztás során a széttekeredett DNS molekulát összefogja, nem engedi, hogy két egyszálú DNS-re váljon, ezáltal megakadályozza a molekulák kifutását a denaturáló gélből. A GC gazdag régió a szekvencia különbségek kimutathatóságát (max. 500-600 bázispárig) 50%-ról majdnem 100%-ra képes javítani (Muyzer és Smalla, 1998). A fokozatos denaturálódás hatására a molekula vándorlása erőteljesen lassul, a GC gazdag régió kívüli szakasz teljesen széttekeredik, és ennél a denaturáló koncentrációnál a vándorlási sebessége szinte teljesen lecsökken. (5. ábra).

Adott DNS amplikon esetén, a DGGE vizsgálatot megelőzően, meg kell határozni az optimális denaturálószer koncentráció tartományt, illetve az amplikonok legjobb elválását megvalósító elektroforézis időtartamot. Erre szolgál a mérőleges gradiens gél, amelyben a denaturálószer gradiense (balról jobbra növekvő) mérőleges az elektroforézis irányára.

(6. ábra). A gél teljes hosszában történik a DNS mintából készített GC-kapcsos PCR termék felvitele. Ugyanazt a mintát meghatározott időközönként (pl. 2 óránként) viszik fel egy PAA gél egymást követő zsebeibe, és vizsgálják, hogy melyik időtartam feleltethető meg a fragmentumok legjobb szétválásának.



6. ábra. Merőleges denaturáló gradiens gélelektroforézis

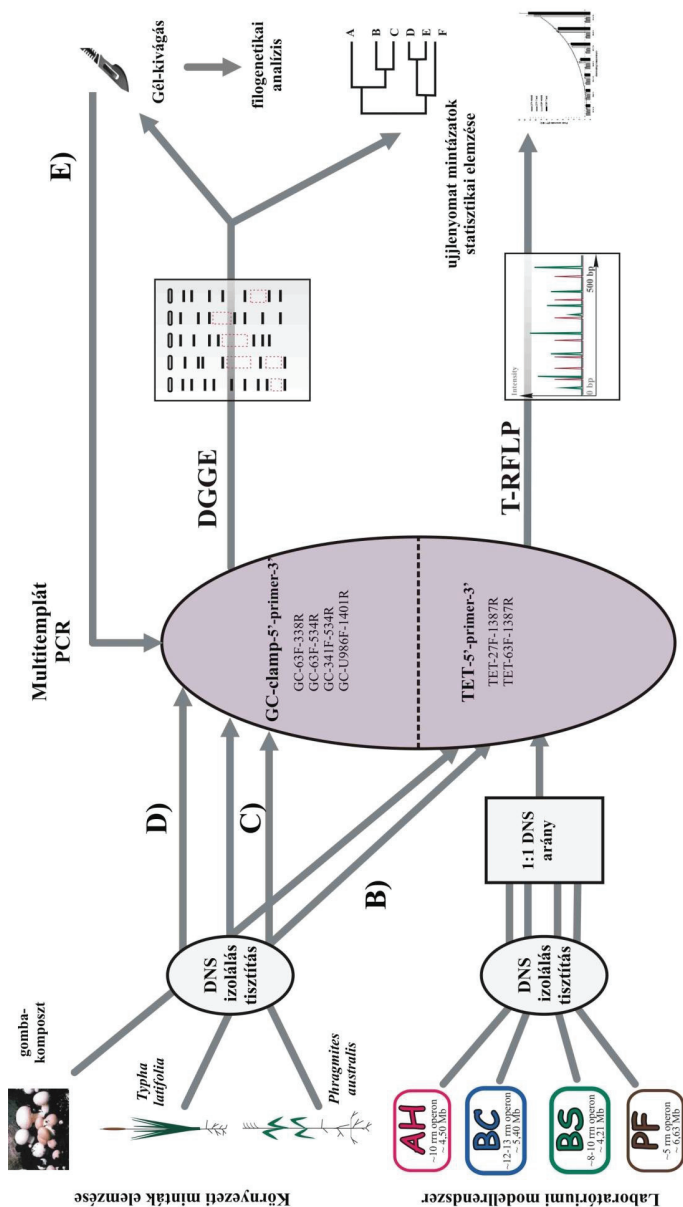
A festést követően a megjelenő mintázat szigmoid görbe alakú. A bal oldalon, ahol kicsi a denaturálószer koncentrációja, a fragmentumok duplaszálú DNS-ként vándorolnak, a jobb oldalon pedig, a nagy denaturálószer koncentráció miatt a hirtelen denaturálódott, széttekeredett DNS molekulák közvetlenül a gélbe lépés után megállnak. A közbülső koncentráció tartományban különböző mértékben denaturálódott és ezáltal különböző vándorlási sebességgel rendelkező DNS molekulák találhatók. A merőleges gradiens gélelektroforézis információval szolgál a minták olvadási tulajdonságait illetően, és a görbe lefutásából megállapítható az elektroforézisnél alkalmazandó optimális denaturálószer koncentráció tartomány. A megfelelő gradiens meghatározását követően az optimális elektroforézis időtartam megállapításához párhuzamos gradiens gélt alkalmaznak.

Az első környezeti mikrobiológiai alkalmazásnál DGGE elemzéssel élőbevonatokat vizsgáltak (Muyzer *et al.*, 1993). Az eredményül kapott sávmintázatban a sávok megfeleltethetők voltak a közösség domináns tagjainak. Teske és mtsai (1996) dán fjordok vizéből izolált közösségi DNS-t vizsgálták, majd a DGGE gélből kivágott darabokból visszanyert DNS bázissorrend meghatározását végezték. Ez a DGGE módszer egyik nagy előnye a több molekuláris „ujjlenyomat” módszerrel szemben, hogy a filospesieszekhez rendelhető csíkok közvetlen szekvencia információval szolgálhatnak. De amint erre a jelen disszertáció is rámutat a csíkok mögött meghúzódó taxonok kiléte több szempontból is kétséges.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt évtizedben a mikrobiális ökológiai vizsgálatok rutinszerű részévé vált a baktériumközösségek nukleinsav kivonáson és PCR-en alapuló molekuláris ujjlenyomat módszerekkel történő feltérképezése. A molekuláris ujjlenyomat mintázatokból közösségek összehasonlítására, egyes esetekben a közösség tagjainak rendszertani azonosítására nyílik lehetőség. Az egyes módszerek különböző mértékben alkalmasak az egyes filospecieszek mennyiségi viszonyainak meghatározására. Azonban a molekuláris ujjlenyomatok kritikai elemzésével nyert mennyiségi adatok is minden esetben csak a multitemplát PCR termék összetételét tükrözik. A multitemplát PCR lépés több szempontból is a legkritikusabb eleme a környezeti minták molekuláris módszerekkel történő feldolgozásának. Komplex környezeti minták esetében kevésbé ismert a PCR során bekövetkező templát-termék aránymódosulások minőségi és mennyiségi jellege; illetve a reakció exponenciális volta miatt a kezdeti ciklusok során fellépő torzító hatások sokszorozódhatnak, mint ahogyan a megelőző lépéseknél (mintavétel, DNS izolálás) bekövetkező változások is, amelyek az eredeti mikroba közösségről kapott kép eredményét megváltoztathatják. A PCR alapú molekuláris módszerek alkalmazásának ezen problematikájával minden közösségelemzés során szembesülünk, amikor olyan kijelentéseket feszegetünk, hogy egy taxon az adott baktériumközösség domináns vagy éppen marginális szereplője akár abundancia, vagy éppen egy anyagszármazékok folyamatban mutatott aktivitás tekintetében.

A probléma megértéséhez elsőként egy érdekes esettanulmányt mutatok be, amely gyakorlati példán (korábbi kutatás buktatóin) keresztül szemlélteti, hogy mennyire fontos a molekuláris mintafeldolgozás során a megfelelő paraméterek megválasztása. Tapasztaltuk, hogy egészen hamis ökológiai következtetésekre juthatunk, ha nem precízen választjuk meg a különböző lépések körülményeit (DNS-izolálás, PCR paraméterek, multitemplát PCR amplikonok elválasztása stb.). Célunk olyan, a mindennapi laboratóriumi gyakorlatban alkalmazható ajánlások megfogalmazása volt, amellyel csökkenthetjük/minimalizálhatjuk a molekuláris mintafeldolgozás PCR lépése során fellépő torzulásokat. Ennek érdekében egy mesterséges modellrendszerben és környezeti mintákon vizsgáltuk a multitemplát PCR fajkompozíciót torzító hatásait; illetve az egyik legelterjedtebb molekuláris ujjlenyomat technikát, a PCR-DGGE módszert a lehetséges legnagyobb mértékű diverzitás-feltérképezhetőség szemszögéből, különös tekintettel a különböző „univerzális” *Bacteria* domén-specifikus 16S rRNS-gén primerek alkalmazására (7. ábra).



A)

7. ábra A modellrendszert alkotó baktériumtörzsek és a környezeti mintákon végzett molekuláris vizsgálatok vázlatja.

A) A multitemplát PCR templát-termék aránymódosulások elemzése mesterségesen beállított DNS templát arányokkal, T-RFLP módszerrel. A törzsek rendje: AH (*Aeromonas hydrophila*), BC (*Bacillus cereus*), BS (*Bacillus subtilis*) és PF (*Pseudomonas fluorescens*). B) A modellrendszerrel nyert eredmények tesztelése gyökény és nád rizoszféra és rizoplán környezetben mintákon szintén T-RFLP módszerrel történt. C) A PCR torzítás mértékének csökkentésére tett ajánlások figyelembevételével párhuzamosan négy 16S rRNS-specifikus „univerzális” primerpárral vizsgáltunk 16 rizoszféra és rizoplán mintát DGGE-ujjlenyomat módszerrel. D) Gombakomposzt bakteriális diverzitás vizsgálatát PCR-DGGE módszerrel végeztük különböző primerpárokat alkalmazásával, filogenetikai analízissel. E) A kevésbé domináns filospécieszek feltérképezésének céljából a DGGE mintázatok háttérfestéséből vágunk ki részeket, amelyeket DGGE módszerrel újra elemeztünk.

Célkitűzéseinket az alábbi pontokban részletezem:

1. Egy konkrét **esettanulmány bemutatása** olyan probléma szemléltetésére, amikor hamis következtetésekre juthatunk nem optimális paraméterek választásával. Korábbi **gombakomposzt diverzitás vizsgálatok** újbóli értelmezése. **Adatbázis készítése** a *Ribosomal Database Project* 10.12-es verziójának (RDP-II, Release 10, Update 12) 920 643 elillesztett 16S rRNS gén szekvenciája alapján a különböző *Bacteria* domén-specifikus primerek illeszkedés-vizsgálatával (7/D ábra).
2. Baktériumtörzsek felhasználásával **egyszerű modellrendszer felállítása**, amelyben megbízhatóan és kvantitatívan lehet detektálni a multitemplát PCR során bekövetkező templát-termék arány-módosulásokat. A PCR termék összetételének elemzésére gyorsan kivitelezhető és költséghatékony detektálási módszerként a T-RFLP-t alkalmazzuk, és a modellrendszer használhatóságának ellenőrzéseként megbízhatósági méréseket végzünk (7/A ábra).
3. A **multitemplát PCR** azon paramétereinek meghatározása és részletes vizsgálata, amelyek az előzetes modellrendszer vizsgálatok alapján nagymértékben befolyásolhatják a multitemplát PCR templát-termék arányok módosulását (primer illeszkedés, primer szelekció, annealációs hőmérséklet és ciklusszám). A legjelentősebb eltéréseket mutató tényezők esetében kísérletet teszünk a torzítás mértékének leírására, jellegének meghatározására (annealációs hőmérséklet és az alkalmazott primer specifikussága) (7/A ábra).
4. A **modellrendszerben** vizsgált PCR tényezők **eredményeinek tesztelése környezeti mintákon** (rizoszféra és rizoplán). Konkrét ajánlások megfogalmazása diverz környezeti minták molekuláris módszerekkel történő feldolgozásához (7/B ábra).
5. A **PCR-DGGE** közösségi ujjlenyomat módszer alkalmazásának tesztelése az eddigi ajánlások figyelembevételével és az „univerzális” primerek használhatóságnak szemszögéből. Érdemes-e párhuzamosan több „univerzális” primerpárt használni egy baktériumközösség diverzitásának PCR-DGGE alapú feltérképezéséhez? (7/C ábra)
6. **Kísérlet** a rizoszféra mintákban található **bakteriális diverzitás teljesebb megismerésére**: a kis számban (kis abundancia) jelenlévő filospécieszek detektálása lehetséges-e egy közösségi mintázat esetén a DGGE gél különböző részeiből visszanyert DNS-ből. (7/E ábra).

IV. ANYAG ÉS MÓDSZER

IV.1 Mintavétel

IV.1.a A modellkísérletekben használt törzsek

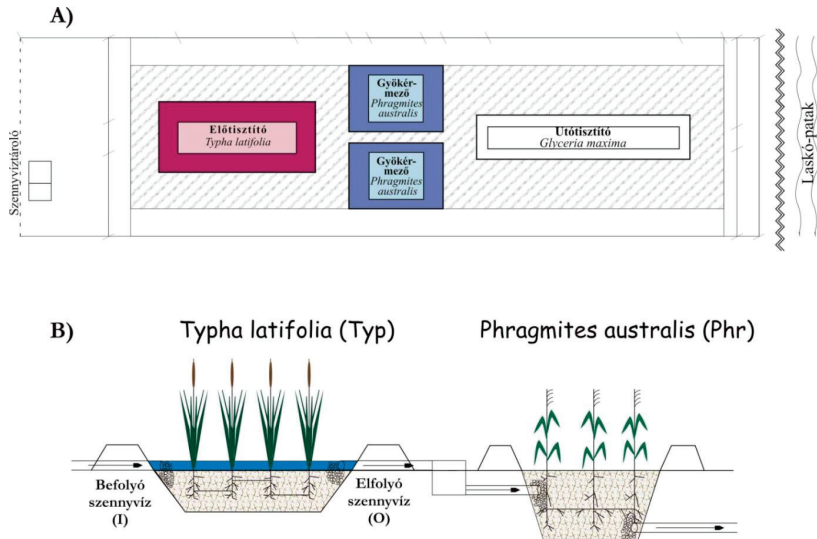
A következő törzseket választottuk modellközösségi vizsgálatainkba: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966); *Bacillus cereus* (ATCC 14579) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525). Kiválasztási szempontként szerepelt, hogy széles körben elterjedt, laboratóriumi körülmények között könnyen fenntartható baktériumtörzsekkel dolgozzunk, amelyek genomi tulajdonságaikban különböznek egymástól (genomméret, 16S rRNS gén kópiaszám, G+C százalékos összetétel). A törzseket DSMZ-1 táptalajon tartottuk fent (<http://www.dsmz.de>).

IV.1.b Rizoszféra és rizoplán minták a demjéni szennyvíztisztító mesterséges lápról

A demjéni csiragyártó üzem ipari és kommunális szennyvíz keverékét kezelő szennyvíztisztító mesterséges lápjának felépítését, medencéinek elhelyezkedését a 8. ábra mutatja. A telep három, sorba kapcsolt rendszerből áll, amelyek a vízáramlás módja és a medencékbe telepített növényzetben különböznek egymástól. A telep hibrid mesterséges láp, amelynek elő és utótisztítója felszíni folyású, a középső gyökérmezős része pedig felszín alatti, horizontális folyású rendszer.

Az előtisztító 40 cm mélységig homokkal töltött medence, amelyben a szennyvíz be- és elvezetése felülről történik. Az előtisztítóban telepített növény a széleslevelű gyékény (*Typha latifolia*), amelyet kitűnő anaerobitás toleranciája és viszonylag sekély gyökérszónája (40 cm) miatt alkalmaztuk. A középső gyökérmezős rész két, egymással párhuzamosan kapcsolt tisztító ágyból áll. A medence mélysége 100 cm, mesterséges szubsztrátként szintén homokot tartalmaz, és az itt alkalmazott növény a nád (*Phragmites australis*). A nádat széles ökológiai toleranciája, kozmopolita elterjedése, mély gyökérzete, gyors megtelepedése és vegetatív szaporodása teszi alkalmassá mesterséges lápokban történő felhasználásra. A szennyvíz bevezetése felülről, elvezetése viszont alulról történik. Az utótisztító 40 cm mélységig homokkal töltött medence, amelyben a szennyvíz be- és elvezetése felülről történik. A telepített növény a harmatkása (*Glyceria maxima*), amelyet jó hatásfokkal alkalmaznak gyökérmezős szennyvízkezelők utótisztítójaként.

A mintavétel 2003. május 28-án és szeptember 7-én történt. A szennyvíztisztító mesterséges láp előtisztító gyékényes, illetve a gyökérszónás nád-medencék állományából speciális mintavevővel 20 x 20 x 30 cm-es, gyökereket és rizómákat tartalmazó rizómatömböket emeltünk ki.



8. ábra. A demjéni gombacsiragyártó üzem mesterséges lápjának vázlata

A) Felülnézetben a medencék elhelyezkedése. A szennyvíz a szennyvíztárolókból az előtisztító, a gyökérmezős és az utótisztító medencéken keresztül folyik, majd a befogadó Laskó-patakba ömlik. **B)** A gyékényes és nád medencék hosszszelvénye. Az előtisztító, gyékénnyel telepített medence felszíni folyású, míg a gyökérzónás nád-medence felszín alatti, horizontális folyású rendszer (szerző saját szerkesztése).

A gyékény esetében a medence elejéről, a szennyvíz befolyási területéről (I), és a medence túlsó végéből, a szennyvíz elfolyási területéről (O) is vettünk mintát (8/B ábra). Ugyanilyen módon a telepített lápi növényeket az eredeti, Egerszalókhöz közeli élőhelyükön (ahol szennyvízzel nem érintkeztek) is mintavételeztük (o). A rizóma mintákat szennyvízzel borítottan szállítottuk a laboratóriumba, és rögtön feldolgoztuk.

A kiválogatott, ép, élő csúcsi gyökérdarabokat (kb. 10 cm hosszú darabok) a hozzájuk tapadó talajszemcsékkel együtt steril vízben, rázatva mostuk. A rázatások után centrifugálással a baktériumok gyökérhez gyengén kötődő frakcióját különítettük el. Mindkét növényi gyökérminta típus esetén ez alkotta a szűkebb értelemben vett rizoszféra frakciót. A gyökérdarabokat további mosási lépésekben addig ráztattuk, amíg a visszamaradó víz látszólag teljesen tiszta nem lett. Ezután a gyökérdarabokat steril körülmények között, dörzsmozsárban üveggyöngy hozzáadásával homogenizáltuk (Nikolausz *et al.*, 2004). Az így kapott minták tartalmazták a rizoplán és hisztoszféra (a gyökér belső szöveti tere) frakciókat is. Az egyszerűség kedvéért a továbbiakban ezeket a mintákat a rizoplánként jelöljük. Az elkülönített rizoszféra és rizoplán frakciókat további feldolgozásig steril, műanyag csövekben -20°C-on tároltuk. A mintafeldolgozás a mintavételi helyeket és időpontokat figyelembe véve

összesen 16 mintát eredményezett, amelyet a 2. táblázat tartalmazza a továbbiakban használt rövidítésekkel együtt.

2. Táblázat. A gyékény és nád rizoszféra frakciók mintáinak jellemzése és a jelölésükre alkalmazott rövidítések.

minták		növény		időpont		rizoszféra frakció*		származási hely	
szám	jelölés	<i>Typha latifolia</i>	<i>Phragmites australis</i>	május	szeptember	rizoszféra	rizoplán	mesterséges láp	természetes láp
1	Typ-IRS-m	Typ		m		IRS		+	
2	Typ-ORS-m	Typ		m		ORS		+	
3	Typ-IRP-m	Typ		m			IRP	+	
4	Typ-ORP-m	Typ		m			ORP	+	
5	Typ-IRS-sz	Typ			sz	IRS		+	
6	Typ-ORS-sz	Typ			sz	ORS		+	
7	Typ-IRP-sz	Typ			sz		IRP	+	
8	Typ-ORP-sz	Typ			sz		ORP	+	
9	Phr-RS-m		Phr	m		RS		+	
10	Phr-RP-m		Phr	m			RP	+	
11	Phr-RS-sz		Phr		sz	RS		+	
12	Phr-RP-sz		Phr		sz		RP	+	
13	Phr-RS-mo		Phr	m		RS			o
14	Phr-RP-mo		Phr	m			RP		o
15	Typ-RS-mo	Typ		m		RS			o
16	Typ-RP-mo	Typ		m			RP		o

*A gyékény minták a szennyvíz befolyási területéről (I) és a szennyvíz elfolyási területéről (O) származnak.

IV.1.c Gombakomposzt minták

A komposzt minták egy magyarországi csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) komposztüzemből származnak, amelyben a komposztálási folyamat lépéseit Gerrits (1988) ajánlásai alapján határozták meg (9. ábra). A komposztálási ciklus első fázisa a 0. napon az alapanyagok elegyítésével kezdődik, mely során 1000 kg búzaszalmát, 890 kg „broiler” csirketrágyát, 200 kg lótrágyát és 80 kg gipszet kevernek össze, majd mindezt 5 m³ vízzel nedvesítik. Az első napon az összekevert nyersanyagokat 5 m x 80 m alapterületű és 2 m magas halmokba rendezik. Az elkövetkező 5 napban a halmokat minden másnap átforgatják és nedvesítik. A 6. napon a komposztot fallal határolt, a padozat felől fűvóka rendszerrel levegőztetett, felül nyitott bunkerekbe termelik át (6 m x 40 m x 4 m). A komposzt halmokat minden másnap új bunkerbe pakolják, és a komposztot a komposztálás 15. napján termelik ki a nyitott bunkerekből, és hagyják egy napot szabadon. Eddig tart a komposztálási technológia I. fázisa a szabadban, majd követi a zárt térben végbemenő II. fázis. A második fázis kezdetén a komposztot zárt hőkezelő alagutakba (4 m x 36 m x 3 m) termelik, amelyben a hőmérséklet és az oxigén koncentrációja szigorúan szabályozott. Az érés során a komposztot először magas hőmérsékleten pasztörizálják (8 órán át 58°C-on tartják) az esetleges gomba patogének

elpusztítása végett, majd a komposztot 3 napig 48°C-on kondicionálják, amíg az ammónia koncentráció 10 mg/L szint alá nem csökken. Ekkor a komposztot hagyják 25°C-ra hűlni. A kész II. fázisú komposzt a csiperke számára már szelektív mikroba közösséget tartalmaz, melyet a hőmérséklet és a megváltozott kémiai tulajdonságok együttesen alakítanak ki. Az érett II. fázisú komposzt kész a csiperke micéliummal való átszövetésre (Székely *et al.*, 2009).



Halom



Bunker



Alagút

9. ábra. Magyarországi komposztüzem komposztálási folyamatának lépései (Berta, 2005).

Teljes komposztálási ciklust több időpontban vizsgáltunk 2003. november és december hónapja során. Mintavételezés az első fázisból a halom és a bunkerkomposztálás során, illetve a második fázisból a hőkezelő alagútból kitermelt érett komposzt esetében történt. A komposzt mintákat további feldolgozásig steril, műanyag csövekben -20°C-on tároltuk. A minták adatait és jelöléseit a 3. táblázat tartalmazza.

3. Táblázat. A komposztminták jellemzése és a jelölésükre alkalmazott rövidítések.

minta jelölés	komposztálás napja	komposztálási lépés	mintavételi hely	dátum
Halom-1	1.	halom-I.fázis	közepe*	2003.11.11.
Halom-3	3.	halom-I.fázis	közepe	2003.11.13.
Bunker-9sz Bunker-9k	9.	bunker-I.fázis	széle† közepe	2003.11.19.
Bunker-15sz Bunker-15k	15.	bunker kitermelés-I.fázis	széle közepe	2003.11.25.
Alagút-22k	22.	alagút kitermelés-II.fázis	közepe	2003.12.02.

*A halom, a bunker és az alagút minták esetében a közepéről származó minták a halmok közepéről, egymástól 6-10 m távolságra vett minták egyesítésével kapott kompozit mintát jelölik. †A bunker szélétől 30 cm mélyről származó minták a széli minták.

IV.1.d Tiszta tenyészetek izolálása komposzt mintából

A tiszta tenyészetek izolálása 2003-2004 között a Korona Gombácsra Üzem, Fajtakutató és Molekuláris Biológiai Laboratóriumában DSMZ-1 és komposztos táptalajokon történt. Az izolátumok az I. és II. fázisú komposztból származnak, illetve közvetlenül az átszövetés előtt. A tenyészetek fenntartása is az említett táptalajokon történt (Berta, 2005).

IV.2 DNS izolálás

IV.2.a DNS izolálás törzsekből

A DNS izolálás kiinduló lépéseként a törzsek tenyészetéből egy kb. 1-1,5 OD₆₀₀-as baktérium szuszpenziót készítettünk, amelyet a *Bacillus cereus* törzs esetében csak 48 órás tenyészetekből sikerült előállítani. A genomális DNS izolálását a V-gene Bacterial Genomic DNA Mini-prep rendszer segítségével (V-Gene Biotechnology Limited, Kína) a törzsek 48 órás tenyészeitől végeztük, a gyártó utasítása szerint. A lizozimos kezelést a Gram-pozitív és a Gram-negatív törzsek esetében is elvégeztük, hogy az izolálás körülményei minden törzs esetében teljesen megegyezzenek. A DNS elválasztása fázis-szeparációval, tisztítása pedig szilikátmembrán segítségével történt. Az izolálás során mindig alkalmaztunk RNáz kezelést, mivel a mintákban maradó RNS torzítást okoz a spektrofotometriás DNS koncentráció meghatározás során. A DNS leoldása 60 µl eluens oldattal (2,5 mM Tris-HCl, pH 8,5) történt.

IV.2.b DNS izolálás környezeti, rizoszféra és rizoplán mintából

Mind a rizoplán, mind a rizoszféra minták esetében ugyanúgy jártunk el: mintánként kb. 200 mg anyagot 1 mL CLS-TC lizispufferben (FastDNA Kit, MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) szuszpendáltunk egy 2 mL-es FastPrep csavaros kupakos műanyag csőben (amely tartalmazta az „A” típusú lizis mátrixot), amelyhez a minták magas huminsav tartalma miatt még kb. 100 mg PVPP-t (polivinil-polipirrolidon) is adtunk. A huminsavak a PCR reakciót gátolják, viszont a PVPP segítségével a huminsavak a mintákból eltávolíthatóak. A csöveket sejtmalomban (20 fordulat/sec; Vibrogen-Zellmühle, Hechingen, Németország) 2 percig ráztattuk. Centrifugálást követően (14 000 g, 8 perc) 900 µl felülúszót új, steril csőbe mértünk át, és a nyers DNS tisztítását a V-gene Bacterial Genomic DNA Mini-prep rendszerrel (V-Gene Biotechnology Limited), a gyártó utasítása szerint végeztük kihagyva az első, feltárási lépést. A DNS leoldása 60 µl eluens oldattal (2,5 mM Tris-HCl, pH 8,5) történt. A rizoplán minták esetében, mivel direkt DNS izolálást végeztünk, a növényi szövetekből származó heterológ DNS-t is kinyertük (növényi DNS, ami tartalmazza a kloroplasztisz DNS-ét is).

IV.2.c DNS izolálás komposzt mintából

500 mg fagyott mintát steril dörmozsárban folyékony nitrogén felhasználásával elporítottunk, és hozzáadtunk 1 mL CLS-TC lizispuffert (FastDNA Kit). Miután a minta felolvadt, a lizátumot steril 1,5 mL-es műanyag csőbe mértük. A sejtmalommal bővített DNS izolálás esetében a fizikai feltárási elősegítésére még 2 perces rázatást is alkalmaztunk (20 fordulat/sec; Vibrogen –Zellmühle). Centrifugálást követően (14 000 g, 5 perc) a csövekből 200 µl felülúszót új, steril csőbe mértünk át, és a nyers DNS tisztítását a Wizard® SV Genomic DNA Purification System rendszerrel (Promega, Madison, WI, USA), a gyártó

utasítása szerint végeztük, kihagyva az első, feltárási lépést. A DNS leoldása 125 µl DEPC-kezelt desztillált vízzel történt (Carl Roth, Karlsruhe, Németország).

IV.3 DNS mennyiség meghatározása

A genomiális DNS és PCR termékek mennyiségének meghatározása spektrofotometrikan az $A_{260\text{nm}}$ méréssel és $A_{320\text{nm}}$ alapvonal korrekcióval, tisztaságának ellenőrzése pedig az $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ arány meghatározásával történt⁴. A méréseket Lambda-35 UV/VIS spektrofotométeren (PerkinElmer, Boston, MA, USA) és B0631080 mikrokvettával végeztük (Quartz SUPRASIL®). Az izolátumok, illetve a tisztított PCR termékek koncentrációját a templátarányok beállításához három párhuzamos méréssel határoztuk meg. Szükség esetén a genomi DNS-eket illetve a tisztított PCR terméket hígítottuk, hogy a spektrofotometrikus meghatározás során a 260 nm-en mért abszorbancia érték a 0,1-1,0 tartományba essen (5-50 µg/mL dsDNA koncentráció tartomány) (Sauer *et al.*, 1998).

IV.4 A tisztított DNS illetve PCR termék detektálása

A genomi DNS illetve PCR termékek detektálásához 1%-os agaróz gélt készítettünk (1 g agaróz, 10 ml 10x TBE puffer [107,8 g/L Tris, 55 g/L bórsav, 7,4 g/L EDTA, pH 8,3], 90 mL bdH_2O és 0,5 µg/mL etídium-bromid). A zsebekbe 3 µl töltőpufferrel (30% [v/v] glicerín, 0,25 mM brómfenol kék) összekevert DNS mintát (5 µl) pipettáztunk. A DNS mintákkal párhuzamosan 2 µl molekulásúly standardot (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker-3 [125-21226 bp tartomány] és pUC Mix Marker-8 [19-1118 bp tartomány]; Fermentas, Vilnius, Litvánia) is futtattunk. Az elektroforézist 100 V-on 20 percig végeztük 1 X TBE pufferben. Az etídium-bromiddal festődött DNS vagy PCR termék jelenlétét áteső UV fényben detektáltuk. Minden PCR esetben ezzel a módszerrel ellenőriztük a szaporított PCR termék megfelelő hosszát, illetve a reakciók specifikusságát (hogy valóban csak a célszekvencia szaporodott, esetleg történt „mispriming”, azaz más nem kívánt szekvencia szaporítása).

IV.5 16S rRNS gén szaporítása PCR segítségével

A genomiális DNS-ből a 16S riboszómális RNS kódoló gént (16S rDNS) PCR segítségével szaporítottuk mind a törzsek, mind a környezeti minták esetében Model 2700 készülék segítségével (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A következőkben egy általános 50 µl végtérfogató „hot start” PCR felépítést és hőprofilját vázoltuk (4. és 5. táblázatok), és a továbbiakban csak az ettől való eltérést, illetve az egyedileg alkalmazott

⁴ Duplaszálú DNS koncentráció (ng/µL) = $(A_{260} - A_{320}) \cdot 50$ µg/mL

Duplaszálú DNS tisztaság = $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$; az elfogadható érték az 1,7-1,9 tartományba esik.

hőprofilokat jelöltük. Az esetlegesen előforduló DNS szennyeződések kiszűrésére minden PCR összemérésénél egy ún. „negatív-kontroll” mintát is futtattunk, amely DNS templát helyett DEPC-kezelt desztillált vizet tartalmazott. Az IV.4 fejezetben említett agaróz gélelektroforézis során győződünk meg arról, hogy valóban nem történt amplifikáció a „negatív-kontroll” mintákban (pl. 12/C ábra).

4. Táblázat. Általános protokoll 50 µl végtérfogatú PCR összemérésére.

<i>komponens</i>	<i>összetétel/koncentráció</i>	<i>mintánkénti mennyiség</i>	<i>premix összemérés</i>
10x PCR puffér	750mM Tris-HCl, 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1% Tween 20	5 µl	
MgCl ₂ oldat	25 mM	4 µl	
dNTP keverék	1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP	10 µl	
desztillált víz	(steril, DEPC-kezelt)	27,0 µl	
forward primer	(3,25·10 ⁻⁴ M)	0,5 µl	
reverz primer	(3,25·10 ⁻⁴ M)	0,5 µl	
Taq polimeráz	1 U/µl	1,0 µl	
templát gDNS		2,0 µl	

5. Táblázat. Egy általános „hot start” PCR hőprofil felépítése.

<i>lépés</i>	<i>hőmérséklet</i>	<i>időtartam</i>	<i>ismétlések</i>
kezdeti denaturáció „hot start”	98°C	5 min	
Taq polimeráz hozzáadása	90°C	10 sec	
primer anneláció	52°C	30 sec	
extenzió	72°C	1 min	32 ciklus
denaturáció	94°C	30 sec	
végso extenzió	72°C	10 min	
hűtés, tárolás	4°C	q.s.	

A PCR reakciók specifikusságát a primerek és a templát DNS együttesen határozza meg. A vizsgálataink során alkalmazott összes 16S rRNS génre specifikus primer adatát és speciális 5'-végi todalékát (GC-kapocs, fluoreszcens festékek) a 6. táblázat tartalmazza. Az egyes „univerzális” *Bacteria* specifikus primerek kötőhelyének elhelyezkedését a variábilis régiókhoz képest a 10. ábra szemlélteti az *E. coli* 16S rRNS gén szekvenciájának megfelelő pozíciókban Baker és mtsai (2003) alapján.

A ciklusszám meghatározásánál figyelembe vettük, hogy környezeti minták 16S rRNS gén alapú amplifikálásához általában 25-35 ciklust szoktak alkalmazni, és ez alapján korábbi vizsgálatainkban is rutinszerűen 32 PCR ciklust alkalmaztunk.

Igaz, tiszta törzsekből izolált genomi DNS-ek sikeres amplifikálásához elegendő lehet kevesebb ciklus is, azonban az összetettebb, különböző annelációs hőmérsékleteken végzett vizsgálatoknál nagy ciklusszámot kellett alkalmaznunk, hogy a nagyon nagy hőmérsékletek esetében is elegendő mennyiségű PCR terméket kapjunk. Próbáltunk közel azonos kísérleti körülményeket biztosítani, ezért a ciklusszám vizsgálat kivételével minden kísérletünkben azonos ciklusszámot alkalmaztunk.

IV.5.a Modellrendszer kidolgozása és megbízhatóságának tesztelése

A baktériumtörzsekből álló modellrendszerben pontosan beállított DNS templát koncentráció arányok mellett a PCR amplikon arány változását követtük nyomon. Az adatok megbízható statisztikai értékeléséhez elengedhetetlen a detektálási módszer pontosságának meghatározása. A teszteléshez a törzsekből külön-külön állítottunk elő PCR termékeket egyaránt a TET-27F-1387R (továbbiakban **27F primerpár**) és a TET63F-1387R (továbbiakban **63F primerpár**) primerpárokkal, amelyek mindegyikét széles körben alkalmazzák mikrobiális közösségek 16S rRNS gén alapú vizsgálatához (4. és 5. táblázatok). Az így előállított monotemplát PCR termékeket közvetlenül a restrikciós emésztés előtt kevertük az általunk beállított arányban. A beállított koncentráció arányok a további mintafeldolgozási lépések: a restrikciós endonukleáz emésztés, az etanol precipitáció és a kapilláris gélelektroforézis (CGE) során módosulhatnak, amely eltérések a detektálási módszer mérési hibahatárát mutatják meg.

IV.5.b Multitemplát PCR termékek előállítása törzsekből és környezeti mintákból

A multitemplát PCR mesterséges templátjaul a modelltörzsekből izolált genomi DNS-ek különböző arányokban és párosításokban történő összekeverése szolgált. Az ún. adatfeltáró vizsgálatok alkalmával a multitemplát PCR templátjaként különböző arányokban (1:1; 1:10 és 1:50), és minden lehetséges párosításban kevertük össze a törzsek genomális DNS-ét. A PCR reakciók során a 27F és a 63F primerpárokat használtuk a 7. táblázatban foglalt kísérleti körülmények mellett. A feltáró vizsgálatok alapján megfogalmazott hipotéziseket további elemzéseknek vetettük alá, és az olyan törzskombinációknál, ahol az előkísérletek során a legmarkánsabb templát-termék aránymódosulásokat tapasztaltuk, részletes, többszörös ismétlésekkel vizsgáltuk a PCR paraméterek változtatásának hatását (annelációs hőmérséklet és ciklusszám). Próbáltuk a lehető legegyszerűbb kísérleti beállításokat alkalmazni, ezért egy kísérletben csak két különböző törzs genomi DNS-ét kevertük össze 1:1 koncentráció arányban, hiszen ebben a felállásban az alkalmazott PCR körülményekkel együtt számos más tényező hatásával is számolni kellett (genomi tulajdonságok, illeszkedési hibák). A pipettázási hibák minimalizálására törekedtünk, ezért mélyreható vizsgálatainkban olyan hőstabil *Taq* polimeráz enzimet használtunk, amelyet az összes komponenssel együtt lehet a reakciókba

bemérni (HotMaster Taq, Eppendorf AG, Hamburg, Németország). Az enzim kis hőmérsékleteken megakadályozza az aspecifikus amplifikációt, mivel a szubsztrát-kötőhelyet egy inhibitor molekula hőmérséklet-függő módon blokkolja. Az enzim működéséhez szükséges Mg^{2+} ion koncentrációt a gyártó által szolgáltatott puffer tartalmazza. A 7. táblázat mutatja a PCR reakciók komponenseinek összeállítását.

7. Táblázat. A modellközösség 1:1 koncentráció arányú keverék templatokon és környezeti mintákon több párhuzamos összeméréssel végzett PCR reakciók összetétele 50 µl végtérfogat esetén.

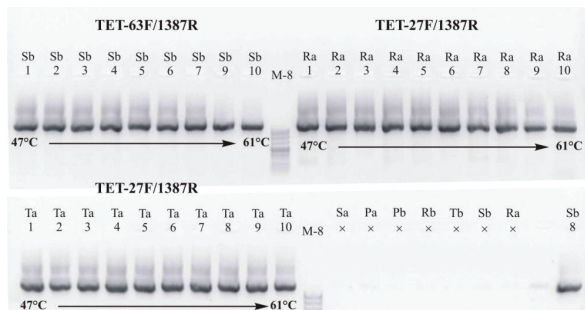
<i>komponens</i>	<i>összetétel/koncentráció</i>	<i>mintánkénti mennyiség</i>	<i>premix összemérés</i>
10xHotMaster puffer	750mM Tris-HCl,	5 µl	
25 mM Mg^{2+} -mal	200mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% Tween 20		
dNTP keverék	1 mM dATP, 1 mM dGTP,	10 µl	
	1 mM dCTP, 1 mM dTTP		
desztillált víz	(steril, DEPC-kezelt)	31,6 µl	
forward primer	$(3,25 \cdot 10^{-4}M)$	0,5 µl	
reverz primer	$(3,25 \cdot 10^{-4}M)$	0,5 µl	
HotMaster Taq (Eppendorf)	5 U/µl	0,4 µl	
templát DNS (20-30ng)		2,0 µl	

IV.5.c Az annelációs hőmérséklet hatásának vizsgálata

A feltárási vizsgálatok során a legnagyobb mértékű aránytorzulás az alkalmazott „univerzális” primerek szelektivitásából adódott. A primer-templát kötés kialakulása a legmeghatározóbb tényező egy célszekvencia sikeres és specifikus felszaporításához. A kötés kialakulását befolyásoló egyik legkönnyebben módosítható tényező az annelációs hőmérséklet. Az általunk alkalmazott primerek (27F és 63F primerpárok) különböző amplifikációs hatékonyságát az annelációs hőmérséklet változásának függvényében több törzskombinációban vizsgáltuk (7. és 8. táblázatok). Gradiens PCR segítségével az annelációs hőmérsékletet széles tartományban ($47^{\circ}C$ – $61^{\circ}C$) változtattuk (Hybaid thermocycler PCR Express, Thermo Electron, Middlesex, Egyesült Királyság). Az 1:1 DNS koncentrációjú törzskombinációkat minden esetben négy párhuzamos összemérésben készítettük, és minden elegyből minden hőmérsékleten három párhuzamos PCR reakciót mértünk össze (11. ábra).

8. Táblázat Gradiens PCR hőprofil felépítése, amelyet környezeti mintán és modellközösségi 1:1 koncentráció arányú keverék templatón végeztünk az annelációs hőmérséklet hatásának vizsgálata során.

<i>lépés</i>	<i>hőmérséklet</i>	<i>időtartam</i>	<i>ismétlések</i>
kezdeti denaturáció „hot start”	$96^{\circ}C$	3 min	
primer anneláció	$47^{\circ}C$ – $61^{\circ}C$	30 sec	32 ciklus
extenzió	$70^{\circ}C$	1 min	
denaturáció	$94^{\circ}C$	30 sec	
végso extenzió	$70^{\circ}C$	10 min	
hűtés, tárolás	$4^{\circ}C$	<i>q.s.</i>	



11. ábra. Gradiens PCR-reakciótermékek detektálása agaróz gél-elektroforézissel.

A PCR-eket *Aeromonas hydrophila* és *Bacillus subtilis* 1:1 koncentráció-arányú genomi DNS templáttal, 4 párhuzamos összemérésben (P-R-S-T elegyek) a TET-27F-1387R (a) illetve a TET-63F-1387R (b) primerpárokkal végeztük. Minden összemérésből különböző annelációs hőmérsékleteken, rendre 47,0°C; 49,6°C; 50,8°C; 52,1°C; 53,4°C; 54,6°C; 55,8°C; 57,7°C; 59,9°C; és 61,0°C-on futott reakció, amelyeket egy adott elegy esetében a Pa 1—Pa 10 jelölésekkel láttunk el. A gélképen minden összemérésből egy sorozat reakcióterméke és a negatív kontroll minták (×) futottak, középen pedig a Marker-8 molekulasúly standard (M-8: 19-1118 bp tartomány).

Ugyanilyen kísérleti körülmények alkalmazása mellett vizsgáltuk az annelációs hőmérséklet hatását gyékény rizoszféra és rizoplán mintákból izolált közösségi DNS-en. A közösségi gradiens PCR esetében négy hőmérsékletet (47°C, 50,9°C, 55,3°C és 59,9°C), mindkét primerpárt (27F és 63F) és három párhuzamos mintát alkalmaztunk egy gyékény rizoszféra és egy rizoplán mintán. A negatív kontroll minták esetében a legkisebb annelációs hőmérsékletet alkalmaztuk, és agaróz gélelektroforézissel igazoltuk a gradiens PCR termékek sikeres szaporítását, illetve, hogy negatív kontroll mintákban nem történt amplifikáció.

IV.5.d A PCR ciklusszám hatásának vizsgálata

A PCR ciklusszám változtatásának hatását szintén vizsgáltuk törzsek 1:1 arányú genomi DNS templát keverékén (12/A ábra), ezen kívül monotemplát PCR termék keverékeken is (12/B ábra), illetve közösségi mintán (12/C ábra). A PCR összeállítása a 7. táblázatnak megfelelően, a reakció a 8. táblázat hőprofilja szerint, 52°C-os annelációs hőmérséklet és változó ciklusszám alkalmazásával történt (törzsek keveréke esetében 54°C-on). Az 1:1 DNS koncentrációjú törzskombinációkat minden esetben négy párhuzamos összemérésben, és minden elegyből minden ciklusszám esetében három párhuzamos PCR reakcióban végeztük a 63F primerpárral. Abban az esetben, amikor a reakció templátjaként genomi DNS helyett a törzsekből nyert, tisztított monotemplát PCR termék szolgált, a PCR termékeket a 27F-1492R primerpárral állítottuk elő, majd ezt követően állítottuk be páronként a PCR termékek 1:1 koncentráció arányú elegyét. Ezekben a kísérletekben tehát szándékosan figyelmen kívül

IV.5.e A komposzt minták PCR-DGGE elemzése

A komposzt minták esetében elkerülhetetlen volt a többlépcsős, „nested” PCR eljárás, mivel többszörös optimalizáció ellenére egy lépésben csak igen gyenge, és mintánként változó erősségű PCR terméket kaptunk, amely további DGGE analízisre nem volt alkalmas. A genomi DNS felszaporítása első lépésben a 27F és 1492R primerekkel történt. Második lépésben a GC-63F-338R (továbbiakban az I-es primerpár) és a GC-968F-1401R (továbbiakban a IV-es primerpár) DGGE primerpárokat használtuk (9., 10. és 11. táblázatok).

9. Táblázat. A komposzt minták és a környezeti rizoszféra frakciók PCR-DGGE analíziséhez használt primerpárok és az általuk amplifikált 16S rRNS gén régiók adatai.

jelölés	primerpár*	amplikon hossz	16s rRNS gén variábilis régiók†
I-es primerpár	GC-63F–338R	313 bp	V1+V2
II-es primerpár	GC-63F–534R	492 bp	V1–V3
III-as primerpár	GC-341F–534R	194 bp	V3
IV-es primerpár	GC-968F–1401R	434 bp	V6–V8

* GC-jelöli a GC-kapcsot a forward primerek 5' végén; † a variábilis régiók elhelyezkedését lásd a 10. ábrán

A komposzt minták esetében még rutinszerűen „touch down” hőprofilokat alkalmaztunk. Ez azért is indokolt volt, mert a mintákból nyert genomi DNS amplifikációja egyes esetekben aspecifikus terméket eredményezett (*mispriming*), ezért a kezdeti ciklusoknál nagy annelációs hőmérsékletet használtunk. Elegendő mennyiségű specifikus termék esetén a későbbi kisebb annelációs hőmérséklet a gyorsabb és hatékonyabb primerkötést szolgálja.

10. Táblázat. Az I-es (GC-63F-338R) primerpárral végzett „nested” PCR reakció „touch-down” hőprofilja.

lépés	hőmérséklet	időtartam	ismétlések
kezdeti denaturáció „hot start”	95°C	3 min	
anneláció	59°C-54°C*	30 sec	10 ciklus
extenzió	72°C	30 sec	
denaturáció	94°C	30 sec	
anneláció	54°C	30 sec	25 ciklus
extenzió	72°C	30 sec	
denaturáció	94°C	30 sec	
végző extenzió	72°C	10 min	
lehűtés	4°C	<i>q.s.</i>	

* Az annelációs hőmérsékletet ciklusonként 0,5°C-kal csökkentettük.

11. Táblázat. A IV-es (GC-968F-1401R) primerpárral végzett „nested” PCR reakció „touch-down” hőprofilja.

<i>lépés</i>	<i>hőmérséklet</i>	<i>időtartam</i>	<i>ismétlések</i>
kezdeti denaturáció „hot start”	95°C	3 min	
anneláció	57°C	30 sec	
extenzió	72°C	45 sec	15 ciklus
denaturáció	94°C	30 sec	
anneláció	48°C	30 sec	
extenzió	72°C	45 sec	20 ciklus
denaturáció	94°C	30 sec	
végso extenzió	72°C	10 min	
lehűtés	4°C	<i>q.s.</i>	

IV.5.f Rizoszféra és rizoplán minták PCR-DGGE elemzése

A demjéni gyékény és nád rizoszféra illetve rizoplán minták sorozatánál (16 minta) a 16S rRNS gén különböző variábilis régiókat tartalmazó részeit szaporítottuk fel négy különböző primerpár (I-IV., 9. táblázat) segítségével a 12. táblázatban jelölt paraméterek alkalmazásával. A DGGE-PCR reakcióknál figyelembe vettük korábbi modell kísérleteink tapasztalatait: kis annelációs hőmérsékletet és egylépéses PCR-t alkalmaztunk, elhagytuk a DGGE analíziseknél korábban rutinszerűen használt „nested” illetve „touch down” lépéseket. A végso extenzió hosszát Janse és mtsai (2004) munkája alapján a korábbi 10 percről 30 percre növeltük. A PCR során keletkeznek nem teljes hosszúságú ampikonok, amelyek olyan másodlagos szerkezeteket eredményezhetnek, amelyek gátolják a polimeráz enzim láncosszabbitsását. A hosszabb ideig tartó magas hőmérsékletű inkubáció azonban megbonthatja ezeket a másodlagos szerkezeteket, és ezzel egyidőben lehetővé teszi az enzim számára a DNS szálak teljes hosszúságú meghosszabbitsását. Minden minta esetében két párhuzamos reakciót mértünk össze, és a parallel PCR termékeket a tisztítási lépés előtt mintánként egyesítettük.

12. Táblázat. A I, II, III, és IV-es DGGE primerpároknál használt PCR hőprofil.

<i>lépés</i>	<i>hőmérséklet</i>	<i>időtartam</i>	<i>ismétlések</i>
kezdeti denaturáció	98°C	5 min	
<i>Taq</i> polimeráz hozzáadása	90°C	10 sec	
primer anneláció	52°C	30 sec	
extenzió	72°C	40 sec	32 ciklus
denaturáció	94°C	30 sec	
végso extenzió	72°C	30 min	
lehűtés, tárolás	4°C	<i>q.s.</i>	

IV.5.g DGGE gél különböző részeiből visszanyert DNS vizsgálata

A DGGE gél különböző részeiből (háttérfestődés) izolált DNS elemzésére szintén gyékény és nád rizoszféra frakciók genomi DNS-ét használtuk, és két megközelítést alkalmaztunk.

1. Egylépéses (DIR) megközelítés: A **GC-63F-338R (I.)** DGGE primerpárt direktbe a környezeti mintából izolált genomi DNS-ekre használtuk.
2. Kétlépéses „nested” (NES) megközelítés: Első lépésben a **27F-1492R** primerpárral végeztük el a környezeti mintából izolált genomi DNS-ekre a PCR szaporítást (4. és 5. táblázatok), majd második lépésként használtuk az **I-es** DGGE primerpárt.

Összevetettük a DIR, egylépéses illetve a NES, kétlépéses PCR-ek DGGE futásának mintázatát. A gél különböző koncentráció tartományú részeiből szabad szemmel láthatóan csíkokat nem tartalmazó gél darabokat vágunk ki és a belőlük visszanyert DNS-t újra szaporítottuk, és DGGE elemzésnek vetettük alá (lásd IV.10 pont).

IV.6 A PCR termékek tisztítása

A PCR termékeket minden esetben a Viogene PCR-M[®] Clean Up System rendszerrel (Viogene-Biotek Corp Sunnyvale, CA, USA) tisztítottuk, amely a 100 bp-10 kb amplikon mérettartományban alkalmazható. A PCR termékekből a tisztítási lépés során távolíthatóak el a beépületlen nukleotidok és primerek, primer dimerek illetve puffer összetevők. A szilikát mátrixon megkötődő DNS-t mosási és centrifugálási lépések sorozatával tisztítottuk. A tisztítás során a Viogene által előírt protokollt követtük, a DNS eluálása 30 µl eluens pufferben történt. Ezt a protokollt használtuk:

- a modellrendszer megbízhatósági méréseinél törzsek esetében előállított TET-es PCR termékekre (27F és 63F primerpárok)
- a DGGE analízishez használt GC-kapcsos PCR termékekre (komposzt, rizoszféra, rizoplán minták)
- a 16S rRNS gén nukleotid sorrend meghatározás előtt (modellrendszer és komposztból izolált törzsek, illetve DGGE csíkokból visszanyert DNS elemzésénél).

IV.7 Restriktációs endonukleáz emésztés

A modellrendszer megbízhatóságának teszteléseként a törzsekből nyert TET-jelölésű monotemplát PCR termékeket közvetlenül a restriktációs emésztés előtt kevertük ismert arányban. Négy párhuzamos összemérést végeztünk minden koncentráció arány beállításnál. 150 ng tisztított és 1:1 arányú PCR terméket emésztettünk 20 µL térfogatban 3 órán keresztül 3 U restriktációs enzim és a megfelelő puffer alkalmazása mellett (13. táblázat). Olyan modellrendszert kellett kidolgoznunk, amelyben a négy törzs terminális fragmentumai jól

elkülönülnek. A teljes 16S rRNS gén bázissorrendek ismeretében *in silico* (mesterséges számítógépes szimuláció segítségével) hasítások segítségével kerestük a megfelelő restrikciós endonukleázokat, amelyek esetlegesen egy mintán belül is képesek mind a négy faj terminális fragmentumát elválasztani. A T-RFLP vizsgálatokhoz általában tetramer enzimeket (*4 base-cutter*: 4 bp hosszú felismerő hellyel rendelkező) szoktak használni, mivel hasító helyük előfordulása jóval gyakoribb, mint a hosszabb felismerő hellyel bíró enzimeké. A törzsek 16S rRNS gén szekvenciáján belül megkerestük a primerek kötőhelyét, és az ehhez legközelebb eső hasítási helyeket vizsgáltuk, ezt követően pedig az *in silico* terminális fragmentumok hosszát kísérletesen is igazoltuk. A kiválasztott restrikciós enzimekkel külön emésztéseket végeztünk: a *Hin6I*, *AluI*, *Csp6I* és *Bsh1236I* enzimek (Fermentas) esetében 37 °C-os inkubációval, a *TasI* enzim (Fermentas) esetében 65 °C-os inkubációval.⁵ (13. táblázat).

13. Táblázat. A T-RFLP elemzések során alkalmazott restrikciós endonukleázok tulajdonságai és működésük optimális feltételei (Fermentas).

enzim	puffer	hasítási hely	optimális hőfok
<i>AluI</i>	Y+/Tango	5' AG↓↑CT	37 °C
<i>Bsh1236I</i>	R+ (red)	5' CG↓↑CG	37 °C
<i>Csp6I</i>	B+ (blue)	5' G↓TAC	37 °C
<i>Hin6I</i>	Y+/Tango	5' G↓CG↑C	37 °C
<i>TasI</i>	B+ (blue)	5' ↓AATT↑	65 °C

A multitemplát PCR termékek enzimés emésztése a modell közösségi illetve a környezeti minták esetében is a fent leírtak szerint zajlott. Ugyanabból a PCR termékből párhuzamosan több enzimmel végeztünk külön-külön restrikciós emésztést. Az enzimátikus emésztéseket etanol precipitációval tisztítottuk (Sambrook *et al.*, 1989), és a kapott pelleteteket –20 °C-on tároltuk. A mintákat közvetlenül a kapilláris gélelektroforézis előtt oldottuk fel 20 µL DEPC-kezelt desztillált vízben.

IV.8 T-RFLP elemzés (minta előkészítés, CGE és ujjlenyomat detektálás)

A minták előkészítéséhez 0,5-1,5 µL enzimátikus emésztésenként 12 µL formamidot és 0,6 µL TAMRA-500 belső méret standardot (GeneScan 500 TAMRA Size Standard, Applied Biosystems) kevertünk. Az így kapott mintákat az elektroforézist megelőzően 96 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd azonnal jégre helyeztük. A fluoreszcensen jelölt terminális fragmentumok elektroforetikus elválasztása az ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied

⁵ A *TasI* enzim esetében az emésztéseket kétszeres térfogatban (40 µL) végeztük, és csak 0,4 U enzimet használtunk az esetlegesen fellépő „star” aktivitás miatt (Robinson és Sligar, 1993). Korábban a *TasI* emésztéseknél, a „star aktivitás” miatt, a törzsek több csúcsban jelentek meg a kromatogramban, az emésztés körülményének módosításával azonban ezek az extra csúcsok eltűntek a kromatogramokból.

Biosystems) automata kapilláris készüléken 10 sec injektálás mellett 30 percen keresztül POP-4™ polimeren (Performance Optimized Polymer 4, Applied Biosystems), 60°C-on és 15 kV-on történt (CGE = kapilláris gélelektroforézis). Minden minta esetben három párhuzamos futtatást végeztünk.

A T-RFLP kromatogramok elemzése a GeneMapper szoftverrel (Applied Biosystems, version 3.7) történt. Az elválasztott csúcsok pontos fragmentumhossz meghatározását a mintákkal együtt futó TAMRA-500 belső méret standard teszi lehetővé, amely rendre 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 és 500 bázispár hosszúságú TAMRA fluoreszcens jelölésű fragmentumokat tartalmazott (21. ábra kromatogramján szürke színnel jelölt csúcsok). A TAMRA-500 standard kétszálú DNS molekulából áll, azonban csak az egyik szál jelölt fluoreszcensen, így denaturáló körülmények között (POP-4™ polimer és 60°C) nem kell számolni a két szál eltérő vándorlási sebességéből eredő kettéhasadt csúcsokkal. A belső méret standard fragmentumaira a kísérleti mintával azonos elektroforetikus erők hatnak, így kompenzálják az injektálások közti eltérésekért. Az alkalmazott mérettartományban a standard fragmentumai egyenletesen eloszanak el, ami lehetővé teszi a csúcsok pontos méretezését (ABI, 2000). A standard fragmentumainak futásával ellenőrizhetjük a futás minőségét is, hiszen a rossz minőségű futások esetén a szoftver nem tudja elvégezni a standard csúcsok pontos méretezését. Az elemzés során a GeneMapper szoftver a kromatogram csúcsaihoz a következő adatokat rendeli:

- a csúcs detektálásának időpontja (időben, illetve adatpontban megadva)
- a csúcs magassága (IFU=fluoreszcens intenzitás egységben kifejezve)
- a csúcs görbe alatti területe (IFU=fluoreszcens intenzitás egységben kifejezve)

A modellrendszer legkritikusabb pontja az elektroforetikus detektálás módja. A készülék fluoreszcens intenzitást mér, amelynek mérési határa 7000 fluoreszcens egység. Mennyiségi kiértékelésre az ún. „túllőtt” csúcsok (*off-scale*) nem alkalmasak, statisztikai értékelésük hibás következtetéshez vezethet. A minták mennyiségét és a futási körülményeket (minta DNS tartalma, injektálás időtartama) úgy kell megválasztani, hogy a detektált TR-F csúcsok magassága ne haladja meg az 5000 IFU értéket.

IV.9 DGGE elemzés (gélöntés, gélelektroforézis és ujjlenyomat detektálás)

Az I-es és III-as primerpárokkal nyert PCR termékek leghatékonyabb elválasztását a 8%-os poliakrilamid (PAA) gél biztosította, amelynek alkalmazása – irodalmi ajánlások alapján – a 200-400 bp hosszúságú amplikonok esetében optimális (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). A hosszabb, II-es és IV-es primerpárok PCR terméke esetén a hatékony elválasztás érdekében 7%-os PAA gél alkalmaztunk. A denaturáló PAA gél elkészítéséhez két törzsoldatot használtunk, amelyek összetételét a 14. táblázat tartalmazza. A

törzsoldatokból 40 % és 70 %-os denaturáló PAA oldatokat kevertünk az előzetes kísérletekben meghatározott optimális gél-elektroforetikus elválasztás, illetve a legnagyobb bakteriális diverzitás feltérképezésének érdekében (15. táblázat).

14. Táblázat. A denaturáló poliakrilamid gél öntéséhez szükséges törzsoldatok összetétele. A 100%-os denaturáló oldat definíció szerint 7 M ureát és 40% formamidot tartalmaz, a 0%-os denaturáló oldat értelemszerűen nem tartalmaz sem ureát sem formamidot. * A vegyszereket a BioRad cégtől szereztük be.

<i>komponensek*</i>	<i>7%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció</i>	<i>7%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció</i>	<i>8%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció</i>	<i>8%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció</i>
40%-os akrilamid oldat (AA : biszAA = 37,5:1)	17,5 ml	17,5 ml	20 ml	20 ml
50x TAE puffer (2M Tris, 1M ecetsav, 0,5M EDTA, pH 8,0)	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Urea	—	42 g	—	42 g
Formamid	—	40 ml	—	40 ml
dH ₂ O (HPLC tisztaságú)	80,5 ml	100 ml-re egészítve	78 ml	100 ml-re egészítve

15. Táblázat. A denaturáló poliakrilamid gél elkészítése a törzsoldatokból.

* A vegyszereket a BioRad cégtől szereztük be.

<i>komponensek*</i>	<i>7-8%-os PAA gél</i>		<i>7-8%-os PAA töltő gél</i>
denaturálószer koncentráció	40 %	70 %	0 %
7-8%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció	14,4 ml	7,2 ml	8 ml
7-8%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció	9,6 ml	16,8 ml	—
TEMED	20 µl	20 µl	7 µl
10%-os ammónium- perszulfát (APS)	100 µl	100 µl	36 µl

A denaturálószeres lineáris gradiensét tartalmazó 28 x18 cm-es PAA gél (32 zsebes) elkészítése az INGENYphorU gélöntő rendszerrel (Ingeny International, Goes, Hollandia), a két különböző denaturáló koncentrációjú oldatból (40-70%) perisztaltikus pumpa és gradiens keverő segítségével történt a gyártó utasítása szerint. Az ammónium-perszulfátot (APS) csak közvetlenül a gélöntés előtt adtuk az oldatokhoz, mivel a polimerizáció az APS hatására indul meg. A denaturáló gradiens gél öntését követően a gél tetejére denaturálószer nem tartalmazó „töltőgél” rétegeztünk, ami minimalizálja a zsebekben rekedt DNS mennyiségét. A tisztított PCR termékeket töltőpufferrel (70% [v/v] glicerín, 0,05% brómfenolkék, 0,05% xilén-cianol, Bio-Rad) kevertük össze, és mintánként közel azonos mennyiséget pipettáztunk a zsebekbe.

Az elektroforézis időtartamát, az alkalmazott feszültség értékét és a denaturáló gradiens tartományát előzetes DGGE optimalizációs futtatások során határoztuk meg. Az elektroforézis 7-8%-os PAA gélen 40-70%-os denaturáló gradiens mellett, 60°C-on, 80V feszültséggel 15 óráig tartott. A minták futtatása INGENYphorU készülékben 1%-os TAE

pufferben történt⁶. Az elektroforézist követően a PAA gélt 45 percig etidium-bromidban festettük (0,5 µg/mL), majd a felesleges festék eltávolítására 15 percig desztillált vízben áztattuk. A kialakuló sávmintázatot UV-fény alatt digitális képrögzítéssel dokumentáltuk.

IV.10 DGGE gélkivágás, DNS eluálás, újra amplifikálás

A poliakrilamid gélből UV fény átvilágítás mellett, steril szikével diszkrét csíkokat illetve csíkok közti gél darabokat⁷ vágunk ki, amelyeket steril csövekbe tettünk. Próbáltunk minél inkább a csíkok középső részébe metszeni. A csíkokra mintánként 20 µl, gél darabok esetében mintánként 60 µl steril DEPC-kezelt desztillált vizet pipettáztunk és 12 órán keresztül 4°C-on inkubáltuk. Másnap a felülúszót átmértük új tesztcsövekbe és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A **gélcsíkokból** eluált DNS-t szekvencia meghatározás céljából ismételt PCR amplifikációnak vettettük alá a korábbi PCR-DGGE analízisnél használt primerpárokkal (lásd IV.5.e fejezet), azonban a forward primer ezekben az esetekben jelöletlen volt. Az így előállított PCR termékeket a szekvencia meghatározás előtt az IV.6 fejezetben leírtak szerint tisztítottuk. A **gél darabokból** eluált DNS-t szintén újabb amplifikációnak vetettük alá, ugyanolyan PCR körülmények és hőprofil alkalmazása mellett, mint a korábbi futásnál (lásd IV.5.g fejezet). Ez esetben a forward primer az 5' végen GC-kapcsot hordozott (I. primerpár). Az így előállított PCR terméket ismételtelen gélelektroforézissel (DGGE) választottuk el.

IV.11 16S rRNS gén bázissorrend elemzése

A törzsek és a DGGE csíkokból nyert 16S rRNS gén bázissorrend meghatározásához a Sanger-féle módszer automatizált változatát és a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing rendszert (Applied Biosystems) használtuk tisztított PCR termékkel (16. és 17. táblázatok).

16. Táblázat. A szekvenáló reakció összetétele 50 µl végtérfogat esetén. A desztillált víz és a PCR termék mennyisége a PCR termék erősségétől függ.

<i>komponens</i>	<i>összetétel/koncentráció</i>	<i>mintánkénti mennyiség</i>	<i>premix összemérés</i>
Big Dye™ Terminator Ready Reaction Mix		2 µl	
5xPuffer (Applied Biosystems)		3 µl	
desztillált víz	(steril, DEPC-kezelt)	12,0-8,5 µl	
szekvenáló primer	(3,25·10 ⁻⁴ M)	0,5 µl	
tisztított PCR termék		2,5-6,0 µl	

17. Táblázat. A szekvenáló reakció során alkalmazott hőprofil.

⁶ A gombakomposzt minták és a DGGE háttérfestődésének vizsgálata során a DGGE analízisek egy másik elektroforézis rendszeren, a Protean II xi készüléken és a Bio-Rad gélöntő rendszerrel történt (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). (Nikolausz *et al.* 2005; Székely *et al.*, 2009)

⁷ A DGGE gél darabok vizsgálata 2001. júliusban vett gyékény és nád rizoszféra mintákkal történtek.

<i>lépés</i>	<i>hőmérséklet</i>	<i>időtartam</i>	<i>ismétlések</i>
denaturáció	96°C	10 sec	28 ciklus
anneláció	50°C	5 sec	
extenzió	60°C	4 min	
hűtés, tárolás	4°C	<i>q.s.</i>	

A módszer alapja, hogy a PCR rekációelegy dezoxi-nukleotidokat (dNTP-k), és ezek didezoxi-nukleotid analógjait (ddNTP-k) is tartalmaz. A polimeráz enzim véletlenszerűen építi be a didezoxi-nukleotidokat, amelyek megállítják a DNS lánc polimerizációját, mert a 3'-OH csoport nélkül nem épülhet hozzá több nukleotid. Végeredményül különböző hosszúságú DNS szakaszok keletkeznek, amelyek a didezoxi-nukleotid analóg fajtájától függően különböző, lézerrel gerjeszthető, fluoreszcens festéket hordoznak. A kapilláris gélelektroforézis után kialakuló méretbeli sorrend megfelel a bázissorrendnek, mert minden szekvenciahosszhoz rendelhető egy fajta jelölés.

A szekvenáló reakcióban mindig csak az egyik primert használjuk. A modellrendszerben szereplő törzsek pontos faji meghatározása során, a teljes 16S rRNS génszakasz lefedése érdekében a bázissorrend elemzést külön-külön több primerrel végeztük [519R, 357F, 803F, 1114F, 1378R, (Lane, 1991); 63F, 338R, 1492R (6. táblázat)]. A primer kötőhelyek pontos megismeréséhez a 16S rRNS gén két végét mindkét irányból szekvenáltuk. A modellrendszer törzseinek 16S rRNS gén bázissorrendjét a GenBank (Benson *et al.*, 2008) publikus szekvencia adatbázisban helyeztük el (Sipos *et al.*, 2007).

A komposzt DGGE csíkok bázissorrend elemzése esetében az I-es primerpár DGGE futtatásából kivágott csíkoknál a 338R primert, a IV-es primerpár DGGE futtatásából nyert csíkok esetében a 968F primert használtuk szekvenáló primerként. A komposzt törzsek és a komposzt DGGE csíkok meghatározott 16S rRNS gén szekvenciáját (Székely *et al.*, 2009) az EMBL [*European Molecular Biology Laboratory*, (Cochrane *et al.*, 2008)] publikus adatbázisban helyeztük el.

A szekvenáló reakció termékeket etanol precipitációval tisztítottuk (Sambrook *et al.*, 1989). A mintákat közvetlenül a CGE előtt 20 µL TS reagensben (Template Suppression reagent, Applied Biosystems) oldottuk fel. Az így kapott mintákat az elektroforézist megelőzően 96 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd azonnal jégre helyeztük. A szekvenáló reakció termékek elválasztását az ABI PRISM 310 Genetic Analyzer automata kapilláris készülékkel végeztük. Az elektroforetikus elválasztás 110 percen keresztül POP6™ polimeren (Performance Optimized Polymer 6), 50°C-on és 12,2 kV-on történt.

IV.12 Filogenetikai elemzések

A kapott szekvenciákat a MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) programcsomag segítségével vizsgáltuk. A GenBank adatbázishoz tartozó BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) program (Altschul *et al.*, 1997) segítségével megkerestük a szekvenciánkhoz legközelebbi rokon szekvenciákat, amiket az adatbázisból letöltöttünk. Ezután a szekvenciákat egymáshoz és rokonaikhoz a ClustalW programmal (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) illesztettük. A szekvenciák filogenetikai viszonyainak ábrázolásához törzsfát hoztunk létre *Neighbor-Joining* módszerrel (Saitou és Nei, 1987) a *Maximum Composite Likelihood* (MCL) helyettesítési mátrix (Tamura *et al.*, 2004) alkalmazásával. Az elágazások megbízhatóságának tesztelése érdekében minden filogenetikai elemzésnél 1000 ismétléses *bootstrap* (Felsenstein, 1985) konszenzus fát hoztunk létre.

IV.13 Primer illeszkedés vizsgálatok a *Ribosomal Database Project* alapján

A *Ribosomal Database Project* 10.12-es verziója (RDP-II Release 10.12) 2009. június 10-én látott napvilágot és 920 643 elillesztett 16S rRNS gén szekvenciát tartalmaz (Cole *et al.*, 2009). Az RDP 10.12 és a *Probe Match* alapján az általunk leggyakrabban használt 10 univerzális primer felhasználásával egy saját adatbázist hoztunk létre (Függelék 23. táblázat). A *Probe Match* funkcióval az oligonukleotid próbák *in silico* illeszkedésvizsgálata végezhető el az alábbi paraméterek megadásával:

1. próba nukleotid bázis sorrendje (5'→3' irányban, <64 bp hosszúságban)
2. negatív (-) vagy pozitív (+) DNS szállal illeszkedik
3. keresés szűkítése doménre
4. keresés szűkítése *E. coli* pozícióra

A keresés eredménye megjeleníthető hierarchikus (taxonómiai), illetve listázott formában és az eredmények tovább szűkíthetők/bővíthetők:

1. megengedett hibák mennyisége alapján (*allowed errors*)⁸
2. adatbázis szekvenciáinak szűkítése szűrők (*filters*) beiktatásával:
 - a. jó minőségű vagy gyanús szekvenciák (*quality: good vs.suspect*)
 - b. 1200 bp-nál rövidebb vagy hosszabb szekvenciák (*size*)
 - c. környezeti mintából vagy tenyésztett törzsből származó szekvenciák (*source: uncultured vs. isolates*)
 - d. típus törzs vagy nem-típus törzs (*strain: type vs. non-type*).

⁸ A primer-illeszkedés vizsgálatoknál a megengedett hibák mennyisége szabadon megadható, amely hibák túlnyomó részét a primer kötőhelyen fellépő különböző mértékű illeszkedési hibák (*mismatch*) teszik ki, de magába foglalják a primer kötőhelyen belül fellépő esetleges inzerciókat vagy deléciókat is. A megengedett hibák maximális száma (*errors allowed*) = 1 + az adott primer hosszának 10%-ában állapították meg, így lehetséges, hogy az adatbázisban a hosszabb primerek esetében 3 mm (*mismatch*) érték is szerepelhet.

A hierarchikus megjelenítésben az illeszkedő szekvenciák és a keresésben szereplő összes szekvencia száma a különböző taxonokra lebontva követhető nyomon. A taxonómiai szintek mélysége szabadon változtatható, így az eredmény egészen szűk spektrumokra is megadható (pl. egyetlen nemzetségre). Ha ennél is részletesebb értékelésre van szükségünk, listázással minden egyes szekvencia illeszkedése egyenként is megtekinthető, az illeszkedési hibák pontos minősége és pozíciója szerint.

Minden primer esetében az elemzést a *Bacteria* és *Archaea* doménekre is elvégeztük és az illeszkedés vizsgálat eredményeként kapott számokat százalékos arányban tüntettük fel az adott primernél. A kereséseket csak az olyan „jó minőségű” szekvenciához viszonyítva végeztük el, amelyek az adott primer kötőhelyének megfelelő *E. coli* régiót lefedték. Az adatbázissal való szekvencia illeszkedés *in silico* összevetését különböző maximálisan megengedett illeszkedési hiba esetében vizsgáltuk (0-1-2-3 *mismatch*) (Függelék 23. táblázat).

IV.14 Molekuláris „ujjlenyomatok” statisztikai elemzése

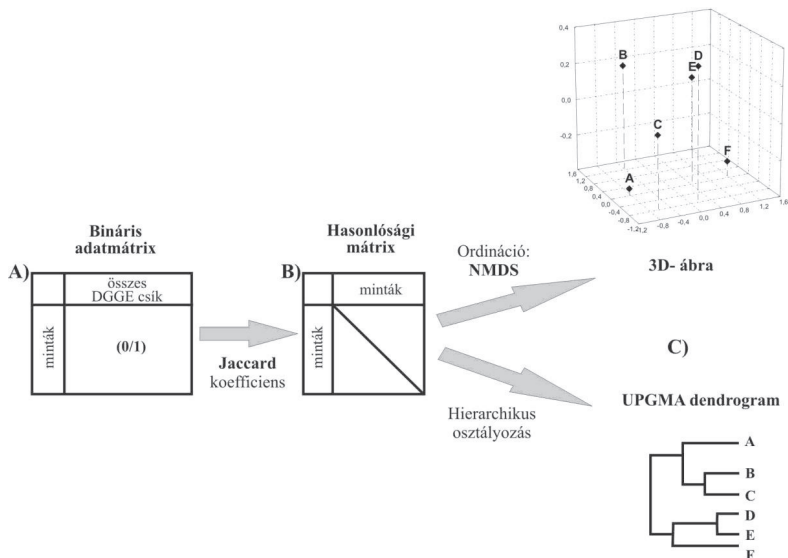
IV.14.a T-RFLP mintázatok elemzése

A környezeti minták T-RFLP profiljának értékeléséhez Saikaly és mtsai (2005) módszerét használtuk a következő módosításokat figyelembe véve: a csúcsok magassága helyett a standardizálást a görbe alatti terület értékre alapoztuk (a primer csúcsok és az 50 IFU érték alatti csúcsok mellőzésével). Az annelációs hőmérséklet hatásának vizsgálatánál az összfluoreszcencia (összesített görbe alatti terület) értéke a 210 402 és 261 963 közötti fluoreszcens egység tartományba, a ciklusszám függés elemzésénél pedig az 54 965 és 75 217 közötti tartományba esett. A ciklusszámnál az összfluoreszcencia értékét a leggyengébb, 18 PCR ciklus adatához igazítottuk. A különböző minták diverzitásának összehasonlítására a Shannon-Weaver diverzitás index (H) értékét a következő egyenlet alapján számítottuk ki: $H = -\sum(p_i) (\log_2 p_i)$, ahol i jelöli az egyes fragmentumokat és p_i jelöli az adott i fragmentum relatív gyakoriságát (Shannon és Weaver, 1949). Az egyes fragmentumok gyakoriságának meghatározását az adott csúcs görbe alatti területének fluoreszcens intenzitás egységben megadott értékével végeztük. Gyakran használják első közelítésben a Shannon diverzitás mutatót bakteriális közösségek diverzitás becsléséhez (Hill *et al.*, 2003; Saikaly *et al.*, 2005). Egy több fajból álló, egyenletes eloszlású közösség nagyobb H értéket ad, mint egy kevesebb fajból álló, vagy nagyon egyenlőtlen eloszlású közösség.

IV.14.b DGGE mintázatok elemzése

A DGGE ujjlenyomat mintázatok elemzését a *TotalLab* gél-kiértékelő szoftver segítségével végeztük (TL120, Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Egyesült Királyság). Az értékelés során háttérfestődés-korrektció, sáv-, illetve csíkazonosítás és mintánkénti összevetés történik. A program az összehasonlítás során egy mesterséges, ún.

referencia sávot hoz létre, ami az adott DGGE gélben előforduló csíkok összességéből áll. Az elemzés végeredménye egy bináris (1/0) adatmátrix, ami tartalmazza a mintákban azonosított összes csíkot, és képezi a további statisztikai elemzések kiindulási pontját (13. ábra).



13. ábra. A DGGE ujjlenyomat mintázatok statisztikai elemzésének vázlata.

A bináris mátrix alapján, a PAST statisztikai szoftverrel [V1.77, (Hammer *et al.*, 2001)] egy Jaccard index alapú 16 x 16-os hasonlósági mátrixot készítettünk (a 16 rizoszféra minta alapján). A Jaccard-index⁹ egy nem-szimmetrikus koeficiens, ami a mindkét mintából hiányzó (dupla nulla) adatokat nem veszi figyelembe (Podani, 1997). Mikrobiális ökológiai vizsgálatokban ajánlott ilyen nem-szimmetrikus hasonlósági koeficienseket alkalmazni (pl. Sorrensen-, Kulczynski-, Sokal-Sneath), mivel a mikrobiális közösségek kimerítő mintavételezése általában nem lehetséges, így egy taxonómiai alapegység (OTU: *operational taxonomic unit*) hiánya két mintában inkább tulajdonítható a teljes információ hiányának, esetleg az alkalmazott módszer kimutathatósági korlátjának, mint valós, közös strukturális hasonlóságnak (Ramette, 2007; Schütte *et al.*, 2008). Az így előállított Jaccard hasonlósági mátrixot felhasználva hierarchikus osztályozást (Hewson és Fuhrman, 2004) illetve NMDS ordinációt (*Non-metric Multidimensional Scaling*, nem-metrikus többdimenziós skálázás)

⁹ **Jaccard-index:** $S_J = \frac{a}{a+b+c}$, ahol a = olyan változók száma, amelyek mindkét összehasonlítandó objektumban megvannak (közös prezencia); b = azon változók száma, amelyek csak az 1. objektumot jellemzik, a másiktól hiányoznak; c = csak a 2. objektumot jellemző, az 1-ből hiányozó változók száma (Podani, 1997).

végeztünk (13. ábra). A hierarchikus osztályozás a PAST programmal és a távolság-optimalizáló UPGMA csoportátlag módszerrel (*Unweighted Pair Group Method of Average*) (Sokal és Michener, 1958; Sneath és Sokal, 1962) történt, amelynek lényege, hogy két osztály távolságát az összes osztályközi, páronkénti távolság aritmetikai átlagával határozzuk meg. Az eljárás során az egymáshoz legközelebbi objektumokat – jelen esetben mintákat – keressük, és ezeket vonjuk össze egy osztályba.

A háromdimenziós (3D) NMDS analízist a STATISTICA szoftverrel (V7.1 StatSoft, Tulsa, OK, USA) végeztük. Az NMDS-t motívumok azonosítására, az adatok háttérében húzódó rejtett szerkezetek tanulmányozására használják. Az ordináció célja olyan mesterséges dimenziók keresése, amelyekkel jól magyarázhatóak a minták közötti hasonlóságok. A minták közötti eredeti távolságértékek közötti különbségeket figyelmen kívül hagyja, és csak a távolságok nagyság szerinti sorrendjét veszi figyelembe. Az NMDS eredményeként minden vizsgált objektum (minta) egy pontnak felel meg a háromdimenziójú térben úgy, hogy az egymás közötti távolságok sorrendje a lehető legjobban közelítse a távolságok eredeti nagyság szerinti sorrendjét. Az NMDS elemzésnél a stressz-érték (*stress value*) mutatja meg, hogy az ordinációval mennyire sikerült rekonstruálni a minták észlelt hasonlóságát. Minél kisebb ez az érték, annál jobb az illeszkedés a reprodukált és az eredeti távolságok sorrendje között.¹⁰ Jelen esetben az a cél, hogy a 16 minta észlelt hasonlóságaiból geometriai ábra készüljön, amely a minták viszonyát a lehető legkisebb torzítással adja vissza. A tengelyek léptékei szabadon változtathatóak, a teljes konfiguráció elforgatható. Az NMDS egyszerűsége abban rejlik, hogy bármilyen módon származtatott hasonlósági- vagy különbözőségi mátrixon is elvégezhető, míg pl. a főkomponens analízis linearitást feltételez. Mikrobiális ökológiában az NMDS elemzést mintasorozaton végzett molekuláris ujjlenyomat technikáknál alkalmazzák, többek között DGGE mintázatoknál is (Schafer *et al.*, 2001; Boon *et al.*, 2002; Calheiros *et al.*, 2009).

A hierarchikus osztályozást és NMDS ordinációt külön-külön mind a négy DGGE primerpárral kapott mintázatra elvégeztük, illetve hasonló módon megvizsgáltuk a négy bináris adatmátrix egyesítésével létrehozott (I-IV.), mesterségesen generált mátrixot is. A két különböző módszerrel kapott ábrákat kombináltuk, és a háromdimenziós NMDS ábrákon bejelöltük az UPGMA osztályozással nyert mintapárosodásokat valamelyik kétdimenziós felületre vetítve (33-37.ábrák). A STATISTICA szoftverrel kapott nyers, fekete-fehér ábrák színes ábrává alakítása a CorelDRAW Graphics Suite – v12.0 szoftverrel készült.

¹⁰ A stressz értékek nagyságára nincs általános szabály, de az ST = 0,05-ös érték már nagyon jónak számít és általában a 0,1-0,2 közötti értékek is elfogadhatók (Podani, 1997).

V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK

V.1 Esettanulmány: Gombakomposzt mikroba közösségének vizsgálata

V.1.a Problémafelvetés és háttérinformáció

A Mikrobiológiai Tanszék régóta foglalkozik a csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) és laskagomba (*Pleurotus sp.*) termesztéséhez használt komposzt szubsztrát mikrobiológiájával. A komposztálás aerob, hőtermelő folyamat, amelyben a szerves hulladék lebontását baktériumok és mikroszkópikus gombák végzik. A gombakomposzt előállítása abban különbözik a hagyományos komposztálásoktól, hogy bizonyos körülményeket (hőmérséklet, aerálás) mesterségesen szabályoznak. A komposztalapanyagokkal bekerülő és átalakuló mikrobióta vizsgálata ipari szempontból is fontos, mivel a komposztról letermelt gomba mennyiségét nagymértékben a komposztban végbemenő mikrobiális anyagcsere-folyamatok határozzák meg. A komposztálás mikrobiológiájáról részletes összefoglaló elemzést olvashatunk Berta (2005) munkájában, ami hiánypótló is, mivel az átszövetésre kész II. fázisú gombakomposztot korábban behatóan nem vizsgálták. A mikroba közösség folyamatosan változik és alkalmazkodik a külső környezeti tényezőkhöz, illetve a változó mértékben hozzáférhető tápanyagokhoz. A komposztálás során kezdetben mezofil majd ezt felváltó termofil mikrobaközösség alakul ki, amelyet az érés során újból egy mezofil bióta vált. A hőkezelő alagútban végbemenő pasztörizálás és kondicionálás után az alacsonyabb hőmérsékleten a korábban kialakult termofil közösség nem aktív, a kezdeti mezofil populáció pedig a könnyen bontható szerves anyagok hiányában nem tud elszaporodni, így jön létre a csiperkegomba számára szelektív és patogénmentes mikrobaközösség (Gerrits, 1988).

Fontosnak tartottuk a gombakomposzt mikrobióta teljesebb megismerésére a polifázikus megközelítést, amely során a hagyományos tenyésztéses és tenyésztés-független, molekuláris módszerek eredményeit vetettük össze. Potenciális oltótörzsek kiválasztása céljából egy magyarországi csiperkegomba komposztüzem különböző fázisú gombakomposzt mintáiból tenyésztésbe vonható baktérium fajok azonosítását, élettani és biokémiai tulajdonságaik meghatározását végeztük el. Molekuláris módszerek segítségével a komposztálás folyamatát és a mikrobióta változását egy nyári, és egy téli mintasorozaton követtük nyomon (16S rRNS gén alapú DGGE és T-RFLP molekuláris „ujjlenyomat” technikák, klónkönyvtár készítés). Az ebből a munkából származó részletes eredményeket nemzetközi folyóiratban sikeresen közzétettük (Székely *et al.*, 2009). A jelen disszertáció a gombakomposzt mikrobióta molekuláris elemzésének legelején felmerülő gondokat szeretné bemutatni, amelyek szorosan összefüggnek a PCR primerek szelektivitásból adódó

torzításokkal, és fényes bizonyítékát adják, hogy a nem megfelelően megválasztott primerek és PCR körülmények alkalmazásával mennyire hamis ökológiai következtetésekre juthatunk.

V.1.b Mikrobiális szukcesszió követése

A vizsgálat legelején célunk egy gyors és költséghatékony molekuláris módszer kidolgozása volt, amivel több komposztálási mintasor szimultán feldolgozható, és a mikroba közösség változása hatékonyabban nyomon követhető, mint a hagyományos és szelektív tenyésztéses eljárással. Kíváncsiak voltunk továbbá, hogy a különböző fázisú gombakomposzt mintákból izolált törzsek filogenetikai meghatározása mennyire fed át a molekuláris vizsgálatok eredményével. A PCR-DGGE technikát választottuk molekuláris ujjlenyomat módszerként, amelyben fontos szempontot kapott, hogy a „domináns” fajok taxonomiai besorolását a DGGE csíkokból nyert direkt szekvencia adatokkal meghatározhatjuk. Egy teljes téli komposztálási ciklust vizsgáltunk (22 nap) a halomtól a bunkerkomposztáláson keresztül egészen a hőkezelő alagút kitermelésével nyert érett, II. fázisú komposzttal bezárólag. A molekuláris mintafeldolgozás során a 16S rRNS gén V1+V2 variábilis régióját szaporítottuk a GC-63F-338R primerpár (I.) segítségével. A többszöri optimalizáció ellenére sem sikerült megfelelő minőségű PCR terméket direkt egylépéses PCR-rel nyerni, így a „nested”, kétlépéses módszert alkalmaztuk. Az első körben a 27F-1492R primerekkel nyert PCR termék szolgált templátként a GC-63F-338R primerpár számára. Amikor ezeket a mintákat feldolgoztuk, a specifikusabb termék érdekében rutinszerűen használtunk „touch-down” PCR protokollokat, amelyeket az első környezeti mintára végzett DGGE során a szerző maga használt (Pearce, 2005).

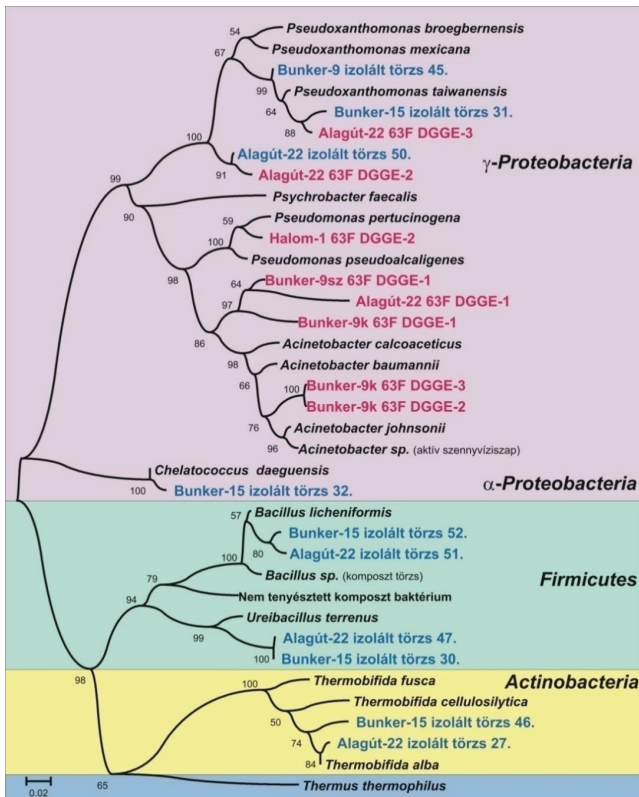
V.1.b.1 Tenyésztés

A tenyésztés eredményeként a komposzt környezetre általánosan jellemző nemzetségek tagjait sikerült azonosítani: *Bacillus* spp. (*B. licheniformis*, *B. mojavensis*); *Thermobifida* spp. (*T. cellulosilytica*, *T. alba*, *T. fusca*); *Ureibacillus* spp., *Pseudomonas* spp.. A 16S rRNS szekvenciák alapján legnagyobb hasonlóságot mutató törzsek nagy részét komposztból vagy ehhez hasonló termofil környezetből izolálták (Strom, 1985; Peters *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007). Ugyanakkor gombakomposztból eddig még le nem írt fajokat is sikerült kimutatnunk. Erre példa a *Pseudoxanthomonas taiwanensis*, amelyet a komposztálás minden fázisából sikerült izolálnunk és az izolált törzsek száma alapján a legnagyobb abundanciájú fajnak bizonyult (Székely *et al.*, 2009).

V.1.b.2 PCR-DGGE feldolgozás

A DGGE mintázat elemzéssel a kezdeti és végső mezofil illetve közbülső termofil fázis mintái egyértelműen elkülönültek egymástól. Azonban a diszkrét DGGE csíkokból nyert és

újra amplifikált 16S rRNS gén szekvenciák meghatározása megdöbbentő eredményre vezetett. Ennek legszembevetőbb szemléltetésére az a filogenetikai törzsfá szolgál, amelyben együtt ábrázoltuk a különböző komposzt mintákból izolált törzsek 16S rRNS gén szekvenciáit és a GC-63F-338R primerpárral kapott DGGE mintázatból nyert szekvenciákat (14. ábra).¹¹



14. ábra A komposzt mintákból származó törzsek és a GC-63F–338R (I.) DGGE futásból visszaizolált parciális 16S rRNS génszekvenciák alapján készített törzsfá (Neighbor-Joining [NJ] módszerrel és a Maximum Composite Likelihood [MCL] helyettesítési mátrix alkalmazásával).

A filogenetikai fa 1000 ismétléssel létrehozott *bootstrap* konszenzus fa, amelyen az egyes elágazások mellett lévő számok mutatják, hogy az 1000 törzsfából milyen százalékban kaptuk meg az adott elágazást. Az ághosszak mértékegysége a bázis szubsztitúciók száma adott nukleotid pozícióban. Az elemzés 310 nukleotid pozíció alapján páronkénti összehasonlítással (*Pairwise deletion*) történt MEGA 4.0 programcsomag segítségével. Az izolált törzseket kék színnel, a DGGE futás csíkjából visszanyert génszekvenciákat piros színnel illetve az ezekhez legközelebbi rokon szekvenciákat fekete színnel jelöltük.

¹¹ Az áttekinthetőség kedvéért a filogenetikai törzsfá nem tartalmazza az összes tenyésztésbe vont törzs 16S rRNS gén szekvenciáját, csak a legfontosabb csoportok képviselőit (14. és 15. ábrák).

Egyértelműen látszik, hogy míg a tenyésztésbe vont törzsek több, nagyobb filogenetikai csoportot is lefedtek (pl. α - és γ -*Proteobacteria*, *Firmicutes* és *Actinobacteria* divíziók); a DGGE csíkokból nyert szekvenciák, függetlenül a minták származásától (Halom-1, Bunker-9 és Alagút-22), kivétel nélkül a γ -*Proteobacteria* nemzetségeivel mutattak rokonságot. Más kutatók sikeresen detektáltak a *Firmicutes* és *Actinobacteria* divíziókba tartozó filospecieszeket komposztálás során DGGE-vel (Takaku *et al.*, 2006), illetve szintén gombakomposztból egy másik molekuláris ujjlenyomat módszerrel, és más 16S rRNS primereket használva [SSCP-vel (Peters *et al.*, 2000)]. Elvetettük azon feltételezést, mely szerint ezek a csoportok nem domináns tagjai a csiperkegomba komposzt mikrobiális közösségének, és csak a tenyésztéshez használt táptalaj szelektivitása miatt izoláltuk őket nagy számban. A jelenség hátterében mindenféleképpen valamilyen módszertani problémára gyanakodtunk, ami magyarázatot adhat a tenyésztéssel illetve DGGE módszerrel kapott bakteriális diverzitások közötti nagymértékű különbségre.

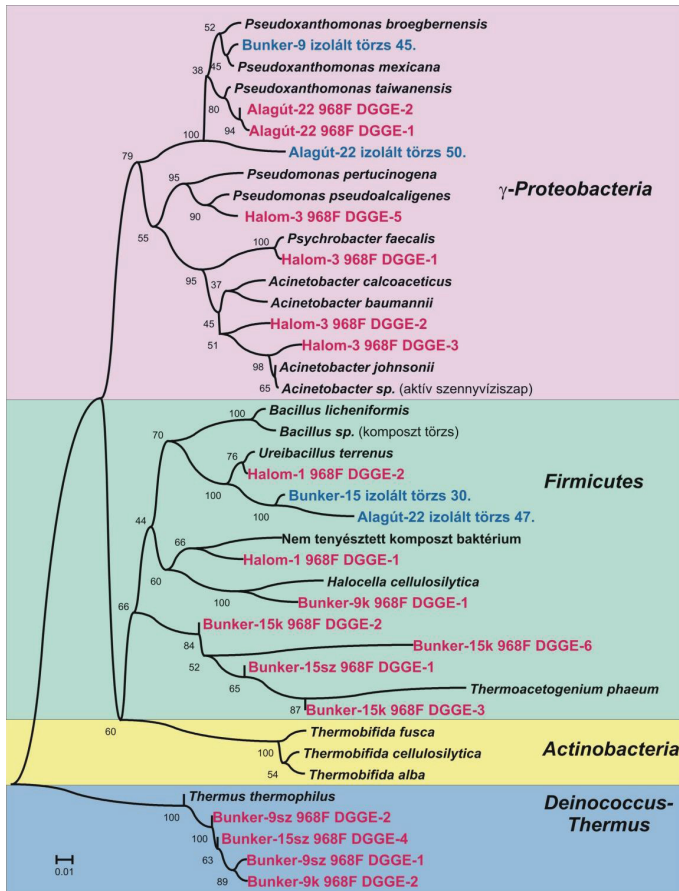
V.1.c Tenyésztés-molekuláris elemzéssel kapott diverzitás eltéréseinek felderítése

Sorra vettük a molekuláris mintafeldolgozás során felmerülő hibalehetőségeket:

1. Lehetséges, hogy a DNS izolálás során **nem elég hatékony sejtfeltárási módszer** alkalmaztunk. Ezáltal a nehezebben feltáródó, Gram pozitív sejtfallal rendelkező fajok (*Firmicutes* és *Actinobacteria* csoport) DNS hozama alacsonyabb lehet, így a további „downstream” feldolgozás során egyáltalán nem jelennek meg, vagy a kiindulási mintához képest csak jóval kisebb arányban kimutathatóak.
2. A **PCR lépések** során **alkalmazott primerek** illetve **körülmények** okozhattak preferenciális amplifikációt, amely bizonyos csoportok túlzott dominanciája miatt más csoportok alulreprezentáltságát, vagy teljes hiányát okozták.
3. A **DGGE technika limitált elválasztásából** adódóan nem alkalmas a gombakomposzt minták szukcessziójának részletes/mélyreható elemzésére, mivel csak a domináns csoportokat lehet kimutatni (Muyzer és Smalla, 1998).

Nem feltételeztük, hogy a sejtfeltárásból adódó eltérések jelentős mértékben befolyásolták volna az ujjlenyomat módszer eredményét, mivel a komposzt környezetből korábban leírt csoportok ismeretében egy igen erőteljes, fizikai sejtfeltárási módszert alkalmaztunk: a mintákat dörzsoszárban folyékony nitrogénnel porítottuk el. A további DNS kivonáshoz pedig egy baktérium sejtekre specifikus lízis puffert használtunk, amelynek pontos kémiai összetétele ugyan nem ismert (pl. detergens tartalom), de az irodalmi adatok alapján egyaránt alkalmas Gram pozitív és Gram negatív baktérium sejtek feltáráására.

A primer szelektivitásából adódó eltérések megvizsgálására a PCR-DGGE elemzést egy másik, szintén „univerzális”, GC-968F-1401R primerpárral (IV) is elvégeztük.



15. ábra. A komposzt mintákból származó törzsek és a GC-968F–1401R (IV.) DGGE futásból visszaizolált parciális 16S rRNS génszekvenciák alapján készített törzsfá (*Neighbor-Joining* módszerrel és a *Maximum Composite Likelihood* (MCL) helyettesítési mátrix alkalmazásával).

A filogenetikai fa 1000 ismétléssel létrehozott *bootstrap* konszenzus fa, amelyen az egyes elágazások mellett lévő számok mutatják, hogy az 1000 törzsfából milyen százalékban kaptuk meg az adott elágazást. Az ághosszak mértékegysége a bázis szubsztitúciók száma adott nukleotid pozícióban. Az elemzés 464 nukleotid pozíció alapján páronkénti összehasonlítással (*Pairwise deletion*) történt MEGA 4.0 programcsomag segítségével. Az izolált törzseket kék színnel, a DGGE futás csíkjaiból visszanyert génszekvenciákat piros színnel illetve az ezekhez legközelebbi rokon szekvenciákat fekete színnel jelöltük.

A V6-V8 variábilis régió felszaporítása ebben az esetben is csak két lépésben sikerült „touch down” hőprofil alkalmazása mellett.¹² A GC-968F-1401R primerpárral végzett gélelektroforézis esetében is diszkrét csíkokat vágunk ki, és a visszanyert 16S rRNS gén nukleotid sorrend meghatározások eredményét szintén a komposzt törzsekkel együtt egy filogenetikai törzsfában ábrázoltuk (ábra).¹³ A 968F-1401R DGGE szekvenciák a GC-63F-338R primerpárnál sokkal nagyobb bakteriális diverzitásról árulkodtak. A két primerpárral külön végzett DGGE mintázatokból nyert szekvencia adatok és az izolált törzsek metszetét a *Pseudoxanthomonas* genus adta, amelyet sikerült a komposztálási fázisoktól függetlenül minden mintából izolálnunk; és mindkét PCR-DGGE módszerrel az átszövetésre kész, II. fázisú komposzt minták domináns tagjának mutatkozott (15. ábra, Alagút 22 minta).

A γ -*Proteobacteria* szubdivízió mellett a *Deinococcus-Thermus* csoport és számos a *Firmicutes* divízióba tartozó nemzetséghez közelrokon 16S rRNS gén szekvenciát sikerült detektálni, amelyek ezek szerint nem a DGGE módszer limitált elválasztásából adódóan nem mutatkoztak meg a GC-63F-338R DGGE mintázatban. A bunker minták mindegyikéből (Bunker-9 és Bunker-15), és minden esetben erős denzitású csíkokból sikerült a *Thermus thermophilus* faj 16S rRNS gén szekvenciáját visszanyerni, ami a termofil mintákban a faj dominanciáját jelzi. Szintén a bunker mintákból sikerült obligát anaerob termofil fajokkal rokon szekvenciákat is kimutatni (*Thermoacetogenium phaeum* és *Halocella cellulosilytica*), amely fajok a komposztban lokálisan kialakuló anaerob mikrohabitatok jelenlétére utalnak.

V.1.d Az Actinobacteria detektálás problematikájának feltárása

A két primerpárral kapott szekvencia eredmények összevetéséből egyértelműen kitűnik, hogy az alkalmazott primerek szelektivitása állhat a detektált diverzitások jelentős különbsége mögött. Azonban az alternatív primerpárral sem sikerült a komposzt mintákban egyetlen, az *Actinobacteria* szekvenciát azonosítani. Ugyan ismert, hogy a módszerrel csak a közösségek meghatározó tagjai detektálhatóak (de Araujo és Schneider, 2008); továbbra is csekély esélyét láttuk, hogy a tenyésztéssel és más molekuláris „ujljenyomat” módszerrel rendszeresen a komposzt közösség domináns tagjaiként meghatározott taxonokat egyáltalán ne tudjuk a PCR-DGGE módszerrel kimutatni. Továbbá az irodalmi adatok alapján a GC-968F-1401R primerpárral DGGE csíkokból már sikerült *Actinobacteria* rokon szekvenciákat azonosítani (Hao *et al.*, 2007). Az *Actinobacteria* „rejtőzködés” hátterében az akkori eredményeink tükrében nem lehetett 100%-osan kizárni egyik fentebb említett tényező hatását sem (V.1.c fejezet)

¹² Bármilyen primer preferencia jelenség esetén természetesen a „touch down” protokoll használata a preferenciális amplifikációból adódó eltéréseket felerősíthette.

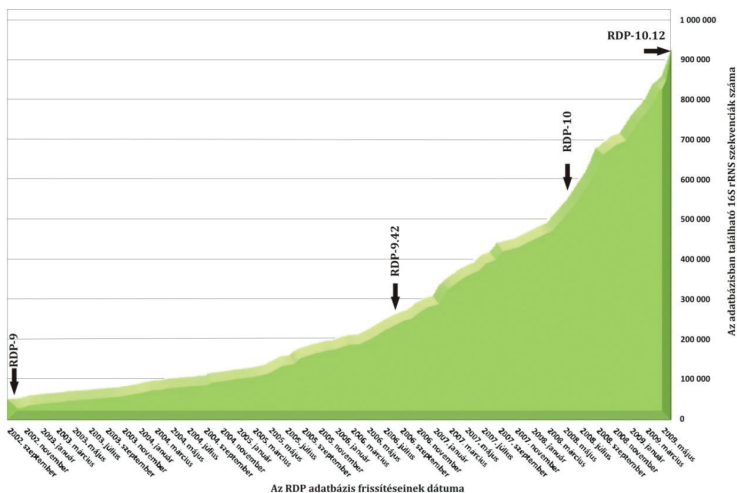
¹³ Sajnos a két különböző DGGE futásból kapott szekvenciákat nem lehetett egy filogenetikai törzsfában ábrázolni, mivel a két primerpárral amplifikált 16S rRNS gén szakaszok nem fednek át (10. ábra).

V.1.d.1 Sejtfeltárás hatékonyságának tesztelése

Hogy egyértelműen kizárhassuk a sejtfeltárásból eredő hibalehetőséget, elvégeztünk egy kontroll kísérletet, amelyben egy további fizikai feltáró lépést alkalmaztunk. A folyékony nitrogén porítás után a mintákat két percig a CLS-TC lizispuferrel sejtmalomban ráztuk. Minden komposzt mintából készítettünk egy folyékony nitrogén és egy folyékony nitrogén+sejtmalmos DNS kivonást. Az így nyert genomi DNS izolátumokat párhuzamosan elemeztük PCR-DGGE módszerrel az ismert GC-968F-1401R primerpárral a korábbi kísérlettel azonos körülmények között. A DGGE ujjlenyomatok elemzése során sem a csíkok számában, sem a csíkok intenzitásában nem találtunk szignifikáns eltérést az ugyanabból a komposztmintából kétféle módszerrel izolált DNS-ek mintázataiban (Berta, 2005). Ebből arra következtettünk, hogy valószínűleg a sejtmalmos rázás már nem fokozta tovább a sejtlízis hatékonyságát, és önmagában a folyékony nitrogén is elegendő feltárást eredményezett.

V.1.d.2 PCR szelektivitás ellenőrzése és korábbi korlátai

Az DGGE eredmények pontos értelmezéséhez elengedhetlenné vált az általunk használt primerek kötőhelyeinek részletes vizsgálata, amelyet az RDP-II adatbázis *Probe Match* funkciójával végeztünk el.



16. ábra. Az Ribosomal Database Project-ben található elljesztett 16S rRNS gén szekvenciák számának alakulása az adatbázis 9-es és 10-es verzióinak frissítése során.

Az RDP 9-es verziója 2002. szeptemberében (50 055 szekvencia), a 10-es verzió pedig 2008. májusában (550 366 szekvencia) jelent meg. Az általunk használt verzió a 2009. június 10-én megjelent 920 643 szekvenciát tartalmazó RDP 10.12.

Az elmúlt öt évben soha nem látott mértékben duzzadtak fel a publikus adatbázisokban található szekvencia adatok (16. ábra, RDP adatbázis). Azonban amikor a primerek kötőhelyének elemzését 2005 áprilisában elvégeztük,¹⁴ az RDP még nem rendelkezett olyan speciális szűrő funkciókkal, amelyekkel az adatbázisban található szekvenciákat minőségi szempontból ellenőrizhettük volna; illetve az adatbázisban való keresés alkalmával nem lehetett a keresési feltételeket egyes gén-régiókra szűkíteni. A primerek szekvencia-hasonlóságára tett következtetéseinket mindig fenntartásokkal kellett kezelni, mivel az adatokat súlyosan torzította, hogy a *Probe Match* program a „nem illeszkedő” szekvenciák közé sorolta az összes olyan szekvenciát is, amely az adott *E. coli* pozíciókban nem tartalmazott nukleotidot. Esetünkben ez hatványozottan érvényesült (pl. a leggyakrabban használt 27F primer esetében), mivel az adatbázisban szereplő szekvenciák nagy részéről teljesen vagy részben hiányoznak a gén két végén bekötő primerek kötőhelyei (17. ábra).

A 9.42-es verzió óta (2006. szeptember) az adatbázisban szereplő szekvenciákat minőségi szempontból osztályozzák, kiszűrjük az esetleges kimérákat és hibákat (RDP *Seqmatch* és *Pintail* programok segítségével); illetve a szekvenciákat „jó” illetve „gyanús/nem megbízható” minőségi kategóriába sorolják. (Ashelford *et al.*, 2005; Ashelford *et al.*, 2006). Ezt a besorolást a havonta megújuló frissítések alkalmával újból elvégzik (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*: INSDC; ami a japán DDBJ, az európai EMBL és az amerikai GenBank adatbázisok szinkronizálását végzi), és így egy adott szekvencia besorolása megváltozhat a gyorsan bővülő szekvencia adattár birtokában. Az eddigi filtereken felül, amelyekkel típus törzs, környezeti minta és 16S rRNS szekvenciahossz alapján lehetett szűkíteni az adatbázisokból lekért adatokat, ezentúl egy új minőségi filtert is alkalmazhatunk az elemzéseinkhez. Továbbá 2008. augusztus óta (RDP 10.2) lehetőségessé vált a keresések szűkítése doménekre, illetve pontos *E. coli* pozíció tartományokra (16. ábra).

V.1.d.3 Az RDP 10.12 szerint adatbázis létrehozása és a primerek tesztelése

A legújabb funkciók segítségével sokkal pontosabb képet kaphatunk a széleskörben alkalmazott univerzális 16S rRNS gén specifikus primerek illeszkedéséről. Szerettük volna tisztázni a komposzt minták PCR-DGGE elemzésével a primerek különbözőségéből adódó anomáliák forrását, és tesztelni az általunk leggyakrabban használt univerzális primerek alkalmazhatóságát. Erre a célra a disszertációm elkészítése idején elérhető legfrissebb verzió a *Ribosomal Database Project* 10.12 verziója (RDP-II *Release* 10.12) állt rendelkezésre, amely 2009. június 10-én látott napvilágot és 920 643 elillesztett 16S rRNS gén szekvenciát tartalmaz. Statisztikai adatait az alábbi táblázatban foglaltuk össze (18. táblázat):

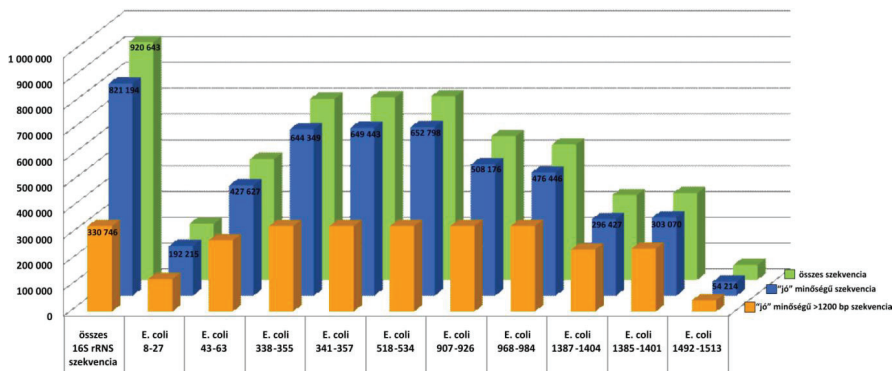
¹⁴ 2005. áprilisi RDP 9.27-es verzió és 136 355 szekvencia alapján történt.

18. Táblázat. Az RDP-II 10.12 verzió alapján az adatbázis 920 643 ellílesztett 16S rRNS gén szekvencia megoszlása a *Bacteria* és *Archaea* doménekben illetve a különböző szűrő beállításokon.

	ÖSSZES szekvencia	“JÓ MINŐSÉGŰ” szekvencia	“GYANÚS” szekvencia	“JÓ MINŐSÉGŰ” > 1200 bp hosszú szekvencia	TENYÉSZTETT törzsek “JÓ MINŐSÉGŰ” szekvencia	KÖRNYEZETI minta “JÓ MINŐSÉGŰ” szekvencia
jelölés	darabszám (%) [*]	darabszám (%) [†]	darabszám (%)	darabszám (%)	darabszám (%)	darabszám (%)
Összes 16S szekvencia	920 643 (100%)	821 194 (89,2%)	99 449 (10,8%)	330 746 (35,9%)	159 527 (17,33%)	661 667 (71,87%)
<i>BACTERIA</i>	875 571 (95,11%)	776 167 (89,42%)	99 404 (99,98%)	322 863 (97,62%)	157 055 (98,45%)	619 112 (93,58%)
<i>ARCHAEA</i>	44 984 (4,89%)	44 968 (5,48%)	16 (0,02%)	7 882 (2,38%)	2 471 (1,55%)	42 497 (6,42%)

^{*} A százalékos adatok az összes szekvenciához viszonyítva lettek megállapítva, az egyes kategóriákon belül pedig a két domén közötti megoszlást mutatják. [†]A primerek illeszkedése a „jó minőségű” 16S rRNS gén szekvenciákkal szemben történt.

Az RDP 10.12 alapján a mikrobiális ökológiai elemzések során az általunk leggyakrabban használt 10 univerzális 16S rRNS génre specifikus primer felhasználásával egy adatbázist hoztunk létre (Függelék 23. táblázat) (Cole *et al.*, 2009), amelyben a különböző 16S rRNS génre specifikus primerek *in silico* illeszkedését minden esetben az adatbázisban megtalálható „jó minőségű” szekvenciákkal szemben vizsgáltuk. (17. ábrán kék oszloppal jelzett szekvenciák száma).



17. ábra. Az RDP-II 10.12-es verziójának összetétele

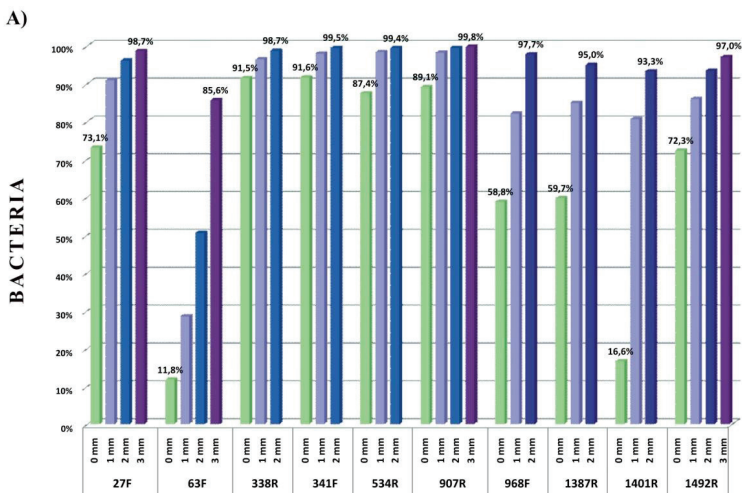
Az első oszlopsor mutatja az adatbázisban meglévő összes 16S rRNS szekvencia megoszlását (zöld) a „jó” minőségű (kék) és 1200 bp-nál hosszabb szekvenciát (narancssárga) tartalmazó kategóriák között. Ugyanezt a megoszlást vizsgáltuk a megadott *E. coli* pozíciókban nukleotid bázist tartalmazó 16S rRNS szekvenciák esetében, amely *E. coli* tartományok megfeleltek az általunk vizsgált 10 univerzális primernek; rendre a 27F, 63F, 338R, 341F, 534R, 907R, 968F, 1387R, 1401R és 1492R primereknek.

Minden primer esetében az illeszkedést a *Bacteria* és az *Archaea* doménekre is megvizsgáltuk a *Probe Match* funkcióval, azzal a kitételrel, hogy a keresésbe csak azok a

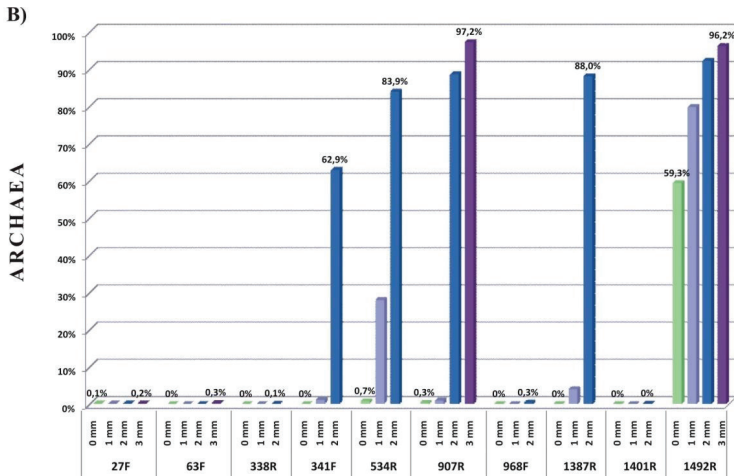
szekvenciák kerüljenek bele, amelyek az adott primer kötőhelyének megfelelő *E. coli* pozíciókban nukleotid bázist tartalmaznak (17. ábra). Az eredményeket a minőségi filterrel szűkítettük, és minden primernél a megengedhető összes illeszkedési hibára (0-1-2-3 mm) külön-külön végrehajtottuk az illeszkedés-vizsgálatot. A keresésekben megadott feltételeknek megfelelően az illeszkedő szekvenciák százalékos arányát a táblázatban az ismert 38 divízióra lebontva adtuk meg (34 *Bacteria* és 4 *Archaea* divízió), illetve a komposzt mikrobióta DGGE vizsgálatának elemzéséhez a *Proteobacteria* csoportot osztály-szintű, a *Firmicutes* és *Actinobacteria* csoportokat pedig rend-szintű bontásban is feltüntettük. Az adatbázisunk segítségével újra elemeztük:

- az univerzális 16S rRNS primerek specifikusságát
- 63F-338R és a 968F-1401R primerpárokkal kapott diverzitás különbség okát
- az *Actinobacteria* csoport detektálásának hiányát a PCR-DGGE elemzések során.

A primerek domén szintű specifikusságának összevetését szemlélteti a külön a *Bacteria* (18/A ábra) és külön az *Archaea* csoportra (18/B ábra) végzett illeszkedésvizsgálatok százalékos eredményének grafikus ábrázolása.



18. ábra. Az egyes „univerzális” 16S rRNS primerek *in silico* illeszkedése az RDP-II 10.12-ben szereplő „jó” minőségű, elillesztett 16S rRNS szekvenciákhoz, a *Probe Match* alapján. A) A primerek illeszkedése a BACTERIA doménen belül található 776 167 db 16S rRNS gén szekvenciához. B) A primerek illeszkedése az ARCHAEA doménen belül található 44 968 db 16S rRNS gén szekvenciához.



18/B ábra. A primereknél megadott értékek a különböző mértékben illeszkedő szekvenciák százalékos arányát jelölik az összes olyan „jó minőségű” szekvenciához viszonyítva, amely tartalmaz nukleotidokat az adott primer által lefedett *E. coli* pozíciókban. A megengedett hibák maximális száma (*errors allowed*) = 1 + az adott primer hosszának 10%-ában állapították meg, így lehetséges, hogy az adatbázisban a hosszabb primerek esetében 3 mm (*mismatch*) érték is szerepel. 0 mm = 100%-os illeszkedés (zöld); 1 mm = maximum 1db illeszkedési hiba (világoskék); 2 mm = maximum 2db illeszkedési hiba (sötétkék); 3 mm = maximum 3db illeszkedési hiba (lila)

A 63F és az 1401R esetében a *Bacteria* csoporton belül szembetűnően kicsi a tökéletes illeszkedést (0 mm) mutató szekvenciák aránya (11,8% és 16,6%). Azonban, míg az 1401R primer már 1 illetve 2 illeszkedési hibával a többi primerhez hasonló nagy arányokat mutatja (80,7% és 93,3%), a 63F primer esetében ezek jóval kisebb értékek (28,5% és 50,5%). A 63F a maximálisan megadható 3 hibával is csak a szekvenciák 85,6%-ával illeszkedik, ami az összes primer közül a legrosszabb hatékonyságról árulkodik (18/A ábra).

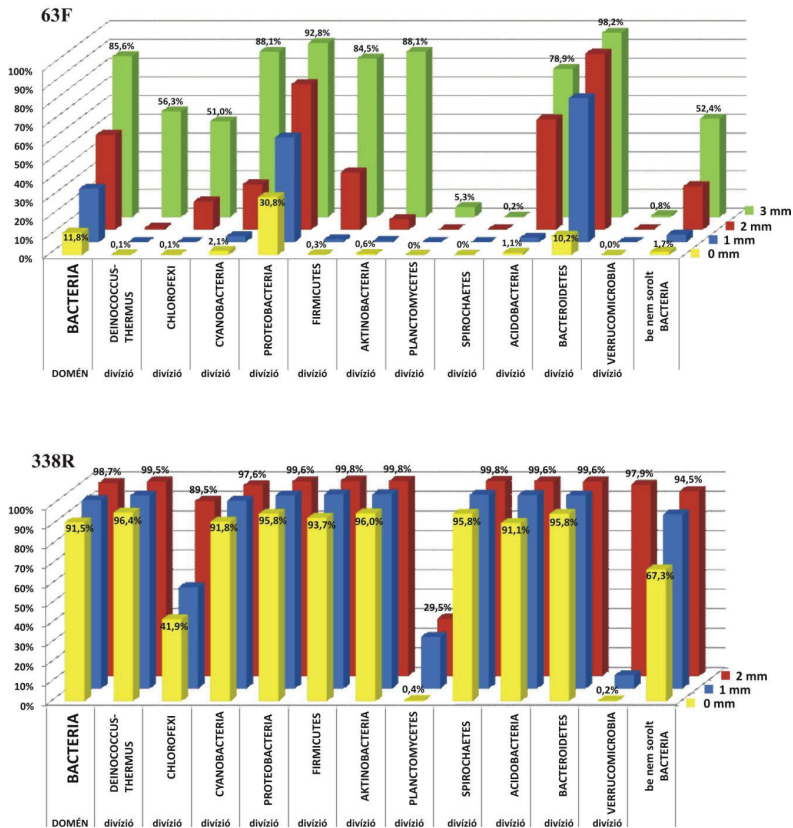
Megállapíthatjuk, hogy a **27F, 63F, 338R, 968F és 1401R** primerek a két domén közül kizárólag a *Bacteria* doménre specifikusak; hiszen ezek a maximálisan megengedett illeszkedési hibával is csak elhanyagolható mértékben illeszkedtek *Archaea* csoportba tartozó szekvenciákhoz (0,0%-0,3%)¹⁵. Ezeket a primereket **univerzális *Bacteria* specifikus** primereknek nevezhetjük (EUB), megkülönböztetve az **univerzális 16S rRNS gén primerektől (U)**, amelyek mindkét prokarióta doménre specifikusak. Ilyen univerzális 16S rRNS primernek nevezhető az **1492R**, ugyanis a primer illeszkedés vizsgálata során mindkét prokarióta domén esetében nagyon magas százalékos találati arányokat kaptunk a

¹⁵ Az ábrán szereplő 0%-os adatok nem feleltethetők meg 0 db szekvenciának, azonban tized százalékra kerekítve 0%-os értéket adnak.

maximálisan megengedett illeszkedési hibák mellett. Szintén az utóbbi csoportba sorolnám az **534R**, **907R**, **1387R** és **341F** primereket is. Igaz, hogy ezekkel a primerekkel az *Archaea* csoportra jóval kisebb mértékű találati értékeket kaptunk, 2 *mismatch* esetén viszont már jelentős, a *Bacteria* csoportéval összemérhető százalékokat mutattak (18/B ábra).

A primerek ilyenfajta osztályozása önkényes, és az előbb említett „köztes” esetekben meglehetősen szubjektív. A primerek pontos besorolása csak egyértelmű, végpontra vonatkozó esetekben lehetséges (27F, 63F, 338R, 968F, 1401R és 1492R). Az alapján is definiálható egy primer univerzális volta, hogy csupán a tökéletes illeszkedés mellett mennyire specifikus; bár ebből a szempontból nézve az **1492R** kivételével a többi 9 primer mind *Bacteria*-specifikusnak tekinthető. Természetesen ez az osztályozás csak az éppen ismert 16S rRNS gén szekvencia-tár alapján történhet meg (jelen esetben az RDP 10.12), azonban elengedhetetlen a primerek besorolásának időről-időre történő felülvizsgálata a bővülő adatok birtokában. Univerzális 16S rRNS gén primerekkel 2003-ban már készült egy átfogó vizsgálat (Baker *et al.*, 2003), amelynek célja új *Archaea*-specifikus primerek tervezése és régebbi primerek felülvizsgálata volt; azonban ezeknél az elemzéseknél csak a tökéletes, 100%-os illeszkedést vették figyelembe és számos, a jelen értekezés szempontjából releváns primert nem vizsgáltak, illetve akkor az elemzésekhez még nem tudták az adatbázisok méretét megfelelően szűkíteni.

Arra már Baker és mtsai (2003) is felhívta a figyelmet, hogy ugyanarra a primerre vonatkoztatva merőben különböző specificitást mutathatnak az egy doménen belül található taxonok. A komposzt anomália tisztázásához az elvégzett illeszkedés-elemzést részletesebb, divízió szintű bontásban is megvizsgáltuk. Az összes primer illeszkedésének specifikusságát a helyhiány miatt a Függelékben ábráztuk (42-45. ábrák). A szövegtörzsben csak a komposzt DGGE szekvenciák szempontjából releváns adatokat mutatjuk be. A 34 *Bacteria* divízió közül csak a 0,5%-nál nagyobb mértékben képviseltetett csoportok szekvencia hasonlóság adatait ábráztuk, azonban ezek a csoportok a teljes RDP 10.12 adatbázis szekvenciáinak tetemes részét, 97,6%-át fedik le (Függelék 41. ábra). A komposzt DGGE elemzéseknél használt primerek esetében még a *Deinococcus-Thermus* divízió adatait is ábráztuk; bár csak 0,2%-át teszi ki az összes keresésbe vont szekvenciáknak, vizsgálatukat szükségessé teszi, hogy ezt a csoportot csak az egyik DGGE primerpárral tudtuk kimutatni.



19. ábra. A 63F és 338R primerek illeszkedése a *Bacteria* domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a *Probe Match* alapján).

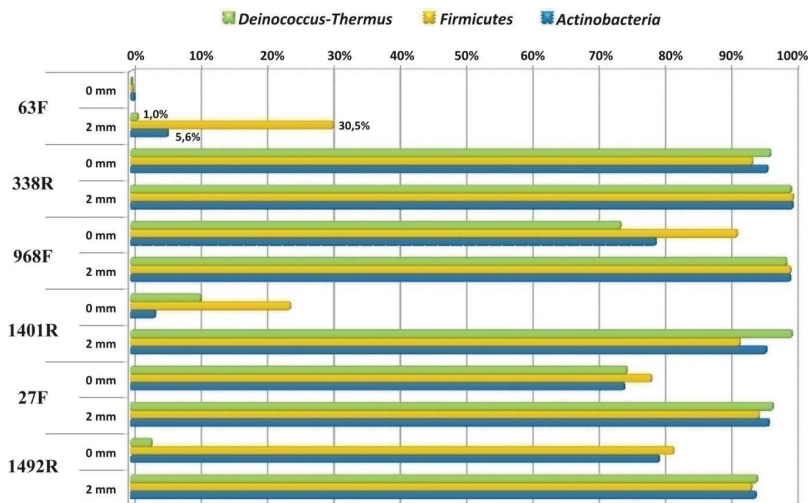
A megadott százalékos értékek rendre a különböző mértékben illeszkedő szekvenciák arányát jelölik az összes olyan „jó minőségű” szekvenciához képest, amely 63F esetében az *E. coli* 43-63 (427 627 db 16S rRNS gén szekvencia) illetve 338R esetében az *E. coli* 338-355 tartományokban (644 349 db 16S rRNS gén szekvencia) nukleotidot tartalmaz. A megengedhető illeszkedési hibák (*mismatch*) száma: 0 mm = tökéletes vagy 100%-os illeszkedés (sárga); 1 mm = maximum 1db illeszkedési hiba (kék); 2 mm = maximum 2db illeszkedési hiba (piros); 3 mm = maximum 3db illeszkedési hiba (zöld)

A DGGE elemzésekhez használt négy primer (63F-338R és 968F-1401R párok) adatait ábrázolva markáns különbségek mutatkoznak az egyes primerek között a tökéletes illeszkedést adó szekvenciák divízió szintű eloszlásában (19. ábra; Függelék 42. ábra). A *Proteobacteria* és *Bacteroidetes* divíziókat leszámítva a **63F** szinte alig mutat 100%-os

illeszkedést a vizsgált csoportokkal.¹⁶ A 338R és 968F primerek esetében tökéletes illeszkedés mellett csak két extrém alacsony értéket kaptunk. (338R primerrel a *Planctomycetes* és *Verrucomicrobia* csoportok rendre 0,4% és 0,2%; a 968F primerrel pedig a *Spirochaetes* és *Bacteroidetes* csoportok rendre 0,3% és 1,9%). Azonban egy csoportot leszámítva, a 338R, 968F és 1401R primerek az 1-2 hibát megengedő illeszkedéseknél már mind nagyon nagy, általában 90% feletti találati arányt mutattak; míg a 63F még 3 mm mellett is nagyon kis arányokat eredményezett, és egyes extrém esetekben bizonyos csoportokat egyáltalán nem lehetett az illeszkedés-vizsgálatoknál kimutatni (*Spirochaetes* és *Verrucomicrobia* csoportok 3 mm mellett is csupán 0,2% és 0,8%). Az egyedüli „közös” kilógó csoport az anammox genusokat is magába foglaló *Planctomycetes*, amelyet mind a négy primer még 2 illeszkedési hibát engedélyezve is nagyon kis mértékben (338R, 968F és 1401R), vagy egyáltalán nem (63F) hoz fel az adatbázisból. Az irodalomban a *Planctomycetes* korábban tapasztalt alulreprezentáltsága adódhatott az univerzális primerek ilyenfajta preferenciájából. A FISH vizsgálatokhoz használt EUB338R próbát módosították is, hogy a *Planctomycetes* taxonokat is „elcsíphessék” (Daims *et al.*, 1999) Az utóbbi években egyre többet tudunk meg erről a csoportról, és kiderült, hogy a kezdetben kizárólag vízi környezetekkel asszociált csoportot direkt és indirekt molekuláris módszerekkel (pl. FISH, klónkönyvtárak stb.) egyre többen írják le domináns csoportként különböző talajokból is (Fuerst, 2004).

A komposzt DGGE vizsgálatok szempontjából kritikus divíziókat (*Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, és *Actinobacteria*) a négy primer szemszögéből külön megvizsgáltuk. Az RDP-10.12 adatbázis elemzésével egyértelműen bebizonyosodott, hogy a két különböző 16S rRNS gén primerpárral végzett DGGE analízis merőben eltérő eredményéért a 63F primer tehető felelőssé. Egy PCR hatékonyságát természetesen mindig a forward és a reverz primerek együttesen határozzák meg, azonban a komposzt esetében a hasonlósági százalékok minden kétséget kizáróan a forward primer erőteljes szelektivitását igazolták (20. ábra). A *Firmicutes*, *Actinobacteria* és *Deinococcus-Thermus* csoport a 63F primer 2 engedélyezett illeszkedési hibával is mindössze 30,5%, 5,6% és 1,0%-os arányban illeszkedett az adatbázis szekvenciáihoz, míg ugyanezek az adatok a többi 3 primernél mind 90% feletti értékek (20. ábra). Továbbra sem kaptunk magyarázatot azonban az *Actinobacteria* hiányára, mivel az illeszkedés-vizsgálat eredménye szerint a GC-968F-1401R primerpár mindkét tagja nagy százalékos arányban illeszkedik a csoportba tartozó szekvenciákhoz.

¹⁶ A 34 divízióból csak 10 csoportnál adott 1% feletti szekvencia hasonlóságot tökéletes illeszkedést feltételezve.



20. ábra. A komposzt PCR-DGGE vizsgálatához használt primerek illeszkedése az RDP 10.12 adatbázis *Deinococcus-Thermus* (zöld) *Firmicutes* (sárga), és *Actinobacteria* (kék) divíziók szekvenciához 0 és 2 megengedett illeszkedési hibával.

A primereknél megadott értékek a különböző mértékben illeszkedő szekvenciák százalékos arányát jelölik az összes olyan „jó minőségű” szekvenciához viszonyítva, amely tartalmaz nukleotidokat az adott primer által lefedett *E. coli* pozíciókban.

Későbbi komposzt vizsgálatokkal, amely során egy átszövetésre kész II fázisú komposzt mintából (Alagút-22) T-RFLP analízist (TET-27F-519R) és parciális 16S rRNS gén klónkönyvtárat (27F-519R) készítettünk, a mintából az *Actinobacteria* csoportba tartozó genusok (*Thermobifida* és *Thermomonospora*) domináns jelenlétét bizonyítottuk (Székely *et al.*, 2009). Ez az eredmény egy végső megerősítést adta annak, hogy a DNS izolálás során megfelelő hatékonyságú sejtfeltárási módszert alkalmaztunk. A két eredmény különbsége magyarázható volt a DGGE módszer elválasztásának korlátaival, illetve azzal, hogy a T-RFLP ujjlenyomat módszer érzékenysége a DGGE-nél nagyobb (Moeseneder *et al.*, 1999), azonban a divízió tagjainak teljes hiánya mindenképp furcsa volt.

Az eddigi eredmények fényében felmerült, hogy nem a „nested” GC-kapcsoló primerpároknál, hanem esetleg már az ezt megelőző PCR lépésnél használt 27F-1492R primerek szelektivitása miatt nem bukkantunk az *Actinobacteria* nyomára. Mindkét primer azonban a „nested” primerpárhoz hasonlóan az adatbázis szekvenciáinak jóval több, mint 90%-ával mutatott illeszkedést 2 megengedett hibával (Függelék 43. ábra).

Tovább kerestünk az *Actinobacteria* problémakörben lehetséges magyarázatok után. Rátaláltunk egy érdekes közleményre (Farris és Olson, 2007), amelyben egy új táptalajt

fejlesztettek ki *Actinomycetes* törzsek tenyésztésére, majd az előállított tiszta tenyészetekből izolált genomi DNS-eket univerzális (24F¹⁷-1492R) és taxon-specifikus primerekkel (24F-ACT878R) egyaránt tesztelték. Megdöbbenve tapasztalták, hogy az *Actinobacteria*-specifikus primerpárral sikeresen (96,3%) felszaporított, és később a teljes 16S rRNS gén szekvencia meghatározással *Actinobacteria* genusokhoz tartozó fajoknak bizonyult törzsekből gyakran (44,8%-ban) nem sikerült univerzális primerekkel a 16S rRNS gén régiót felszaporítani. A PCR körülményeket a lehető legalaposabban határozták meg, hogy kiszűrhető legyen a nem optimális PCR tényezők hatása (alacsony, 50°C-os annealáció, hosszabb extenzió, jó minőségű DNS, ami pozitív PCR eredményt adott más primerekkel). Mivel a forward primer a két PCR-nél azonos volt, nem a 24F primer esetleges illeszkedési hibáit, hanem az általunk is használt **1492R** primert kezdték vizsgálni. Egy univerzális 16S rRNS gén forward primer (1406F) és egy *Actinobacteria*-specifikus 23S reverz primer (ACT-23S-R) kombinációjával az 1492R primer kötőhely és az ITS (*internal transcribed spacer*) régió nukleotid sorrendjét határozták meg. A törzsek reverz primer kötőhelyei azonban minden esetben 100%-os szekvencia egyezést mutattak a 1492R primerrel, és a teljes 16S rRNS gén szekvenciák másodlagos szerkezetének elemzése sem mutatott ki semmilyen konformációs problémát, ami a sikertelen PCR-eket magyarázhatta volna. Lehetséges, hogy más, a felszaporítandó szekvencia tartományon kívül eső DNS-ek gátló hatása érvényesülhet (Hansen *et al.*, 1998; Farris és Olson, 2007), az azonban mindenképpen döbbenetes, hogy az *Actinobacteria* osztályon belül egyes mikrobák esetében a tökéletes (100%-os) primer illeszkedés, alacsony annealáció és optimális PCR körülmények sem garantálják a sikeres PCR felszaporítást. Ráadásul a fent említett vizsgálatban a törzsek ARDRA mintázata alapján meghatározott 16 OTU közül 11-nek volt olyan képviselője, amelyet nem sikerült amplifikálni; ami azt jelzi, hogy a talaj bakteriális közösségének feltehetően jelentős részét, az adott mikrobiális diverzitás széles spektrumán nem tudták univerzális primerekkel kimutatni.

A Farris és Olson (2007) által tapasztalt 1492R-primer és *Actinobacteria* „rejtőzködés” jelensége a komposzt DGGE vizsgálatokban is szerepet játszhatott, és magyarázhatja, hogy miért nem tudtuk egyik DGGE primerpárral sem kimutatni az első PCR lépésnél előállított 27F-1492R PCR termékből az *Actinobacteria*-fajokat. Ezt akkor tudtuk volna minden kétséget kizáróan bizonyítani, ha sikerült volna a DGGE primerpárokat a komposztból izolált genomi DNS-re direkt, egy-lépéses PCR-ben alkalmazni. Ne felejtjük el azonban, hogy a GC-63F-338R primerpár esetében az ismert illeszkedési problémák miatt csak a nagyon alacsony precizitású PCR körülmények vezethettek volna célra. Sajnos a kezdeti komposzt DGGE elemzéseknél mindkét DGGE primerpár esetében *touch-down* hőprofil alkalmaztunk,

¹⁷ A Farris és Olson (2007) által 24F-ként használt primer szekvenciája egyetlen nukleotid pozícióban különbözik az általunk használt 27F primertől; miszerint a primer nem degenerált, és az 5' végtől számított 12. nukleotid egy citozin (C).

ami az illeszkedési hibákból adódó preferenciális amplifikációt mindkét esetben tovább erősítette.

A 63F primer problematika végső illusztrálására Knapp és mtsai (2009) munkáját említhetjük példaként, akik egy diplopoda faj (*Cylindroiulus fulviceps*) bél-mikrobiótáját PCR-DGGE módszerrel és három különböző: egy 16S rRNS gén *Bacteria*, egy 16S rRNS gén *Archaea* és egy 18S rRNS gén *Fungi* specifikus primerpárral vizsgálták. Az általunk tapasztalt anomáliához hasonló problémába ütköztek a baktériumközösség PCR-DGGE elemzése során. Knapp és mtsai (2009) sem tudták detektálni a korábban diplopoda bél-mikrobiótából tenyésztéssel, fenetikai bélyegek alapján leírt (Márialigeti *et al.*, 1985), illetve izolált törzsek 16S rRNS gén szekvenciája alapján azonosított *Actinobacteria*-kat (Oravec *et al.*, 2002). Knapp és mtsai azzal magyarázták a jelenséget, hogy maga a DGGE módszer jellegéből fakadóan nem találhatóak az *Actinobacteria*-k, ugyanis a módszerrel csak a mikrobiális közösség domináns tagjai detektálhatóak (Muyzer és Smalla, 1998). A DGGE módszerhez a **GC-984F-1378R** primerpárt használták (Heuer *et al.*, 1997), amely forward primere megegyezik az általunk **968F** primerként jelölt oligonukleotiddal, reverz primerét pedig külön ellenőriztük az RDP 10.12 alapján és itt sem mutatkozott probléma (45. ábra)¹⁸.

Elkerülte azonban figyelmüket az az alapvető tény, hogy az izolált genomi DNS-ből első körben a 16S rRNS gént a **63F-1378R** primerekkel szaporították fel, és ők is „nested” PCR-ként állították elő a DGGE-hez szükséges GC-kapcsos ampliconokat. Ha még egy pillantást vetünk az RDP 10.12 alapján végzett primer és adatbázis szekvenciák közötti illeszkedésvizsgálat eredményeire (Függelék 40. ábra): az *Actinobacteria* hiánya és a *γ-Proteobacteria* dominancia jelensége [DGGE szekvenciák 72,2%-a, (Knapp *et al.*, 2009)] mind teljesen egybevág a 63F primernél tapasztalt illeszkedési problémákkal.

Fontos felhívni a figyelmet, hogy bármilyen PCR-alapú mikrobiális közösségelemzés során feltétlen körbe kell járni a primerek szelektivitásának témakörét minden alkalmazott lépésnél egyenként, hogy elkerülhessük a közösség szerkezetére vonatkozó hamis következtetéseket. A fentebb említett példához hasonlóan 16S rRNS gén klónkönyvtárak túlnyomó *Proteobacteria* és *Bacteroidetes* dominanciájához hozzájárulhatott a 63F-1378R primerek alkalmazása (Ellis *et al.*, 2003; Kaufman *et al.*, 2008). Feltehetően még erőteljesebben jelentkezhetett a 63F primer preferenciája az igen magas (60°C-os) annelációs hőmérséklet használata miatt.

¹⁸ Az **1378R** primer tökéletes illeszkedést feltételezve 76%-os azonosságot adott az adatbázis *Actinobacteria* szekvenciáihoz, amely arány már 1 illeszkedési hibával 93%-ra nőtt.

V.1.e Összegzés

- A két DGGE primerpárral kapott **jelentős diverzitásbeli különbség** hátterében három tényező hatását feltételeztük:
 1. a DNS izolálás során a sejtfeltárás hatékonysága
 2. az alkalmazott PCR körülmények és primerek szelektivitása
 3. a DGGE elválasztás hatékonysága
- A DNS izolálás során végzett **sejtfeltárás hatékonysága elégségesnek** bizonyult. További fizikai feltáró lépések nem változtattak a DGGE közösségi mintázatokon és a molekuláris módszerrel nem kimutatott csoportokat sikerült ugyanabból a komposzt genomi DNS-ből más módszerrel (16S rRNS gén klónkönyvtár) kimutatnunk.
- Az univerzális primerek illeszkedését az RDP 10.12 adatbázis szekvenciáihoz különböző illeszkedési hibák alkalmazása mellett elvégeztük, a primerek illeszkedéséről **taxonómiai csoportokra bontott saját adatbázist** hoztunk létre.
- Az ún. univerzális **16S rRNS gén primerek specifikusságát** a publikus adatbázisokban hihetetlen ütemben termelődő szekvenciákkal időről-időre **ellenőrizni kell**.
- Egészen extrém eltérések jelentkezhetnek az univerzális/*Bacteria* domén specifikus 16S rRNS gén primerek illeszkedésében a különböző taxonómiai csoportok között.
- **Két *Bacteria* divízió** esetében (*Deinococcus-Thermus* és *Firmicutes*) egyértelmű **összefüggést találtunk a 63F primer szelektivitása** és DGGE csíkokból a csoportok sikertelen kimutatása között.
- Az *Actinobacteria* csoport „rejtőzködése” nem a DGGE primerek különbözőségéből fakadhat; az ok feltételezhetően az **1492R primernél** mások által is tapasztalt, de ez ideáig még nem tisztázott **PCR szelektivitás**. Nem zárható ki 100%-osan a DGGE módszer elválasztás-technikai korlátainak szerepe sem.

V.2 Modellrendszer felállítása

V.2.a A törzsek terminális fragmentumainak meghatározása *in silico* és empirikus módszerekkel

Négy baktériumtörzsből álló modellrendszert állítottunk fel, amelynek segítségével mesterségesen beállított DNS templát arányok mellett követhetőek a multitemplát PCR során bekövetkező aránymódosulások (7/A ábra). A modellrendszerben szereplő baktériumtörzsek kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy ezek a törzsek széles körben elterjedt, laboratóriumi körülmények között könnyen fenntartható törzsek legyenek, amelyek a tanszékünkön rendelkezésre állnak. A multitemplát PCR vizsgálatához olyan primereket választottunk, amelyeket a mikrobiális ökológiában előszeretettel alkalmaznak bakteriális közösségek összetételének 16S rRNS alapú térképezésére (27F, 63F és az 1387R; 6. táblázat). A törzsek pontos filogenetikai azonosítására a törzsek teljes 16S rRNS gén nukleotid bázissorrend meghatározását elvégeztük (Sipos *et al.*, 2007); és a génszakaszok ismeretében az egyes primer-enzim kombinációk esetében meghatároztuk az elméletileg várható (*in silico*) terminális restrikciós fragmentum hosszakat (19. táblázat).

19. Táblázat. A modellrendszerben használt baktériumtörzsek *in silico* terminális fragmentumhosszai a kísérletekben alkalmazott forward primer és restrikciós endonukleáz hasítóhelyének függvényében.

törzs	jelölt forward primer	restrikciós endonukleáz emésztéssel nyert T-RF hossz (bp)				
		Hin6I G↓CGC	Csp6I G↓TAC	TasI ↓AATT	Bsh1236I CG↓CG	AluI AG↓CT
<i>Aeromonas hydrophila</i> (AH)	TET-27F	213	885	124	215	76
	TET-63F	178	850	89	180	41
<i>Bacillus cereus</i> (BC)	TET-27F	577	487	196	237	74
	TET-63F	542	452	161	202	39
<i>Bacillus subtilis</i> (BS)	TET-27F	238	455	558	235	73
	TET-63F	203	420	523	200	38
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (PF)	TET-27F	205	877	545	389	72
	TET-63F	170	842	510	354	37

A PCR-ekhez használt reverz primerként minden esetben az 1387R szolgált (6. Táblázat).

A törzsekből izolált genomi DNS-ekből a TET-27F-1387R (továbbiakban 27F primerpár) és a TET-63F-1387R (továbbiakban 63F primerpár) primerpárokkal szaporítottuk az adott 16S rRNS génszakaszokat, és minden törzsrre egyenként kísérletesen is meghatároztuk az egyes T-RF-ek hosszát. Az *in silico* és az empirikus értékek közötti eltérések jelensége ismert a T-RFLP elemzést használók körében (Osborn *et al.*, 2000; Kaplan és Kitts, 2003). A két érték közötti eltérést Kaplan és Kitts (2003) TRF elcsúszásként (*TRF drift*-ként) definiálta. Az elektroforetikusan elválasztott DNS molekulák tömegének akár apró

eltérése is befolyásolja az empirikusan tapasztalt fragmentum hosszakat.¹⁹ Sajnos az eltérések mérettartományonként is különböznek, a legnagyobb eltéréseket az irodalmi adatokkal összehangban a <100 bp és >400-500 bp tartományokban észleltük [21/C ábra; (Schütte *et al.*, 2008)]. Ezeket az eltéréseket mindenki tapasztalja, ennek mértéke azonban minden esetben függ az elektroforézis berendezés fajtájától (gél, vagy kapilláris gélelektroforézis), a kísérleti körülményektől [milyen fluorofórral jelölt a PCR termék és a belső méret standard; (Pandey *et al.*, 2007)], és nem utolsósorban az adatok kiértékeléséhez használt algoritmustól. A TRF elcsúszás jelensége azonban modellrendszerünk esetében nem okozott problémát, mivel a törzsek T-RF-jei egy csúciban mutatkoztak az elektroferogramokon; a csúcsok azonosítása egyértelmű volt, és az egy futás során elválasztott csúcsok távolsága -2-3 bp pontossággal megegyezett az *in silico* számított értékekkel.

V.2.b A restrikciós enzimek kiválasztása

A környezeti minták mikrobiális közösség elemzésénél az enzim megválasztás legfőbb szempontja, hogy a lehető legnagyobb számú filospécies (OTU) elválasztását tegye lehetővé²⁰. Manapság *in silico* szekvencia hasítások elvégzésével programok széles skálája segíti a megfelelő restrikciós enzim kiválasztását [TAP T-RFLP (Maidak *et al.*, 2000); MiCA 3 (Shyu *et al.*, 2007); REPK (Collins és Rocap, 2007)]. Ezeket a programokat azonban leginkább azokban az esetekben érdemes használni – és ezek a jóval ritkább esetek –, amikor ismert szekvencia készlettel dolgozunk, és ehhez keresünk olyan primer-enzim kombinációkat, amelyek legjobban képesek a csoporton belül az egyes taxonokat egymástól elválasztani. Természetesen ezek a virtuális hasításokat végrehajtó programok is „hozott anyagból” dolgoznak: a még nem ismert 16S rRNS gén szekvenciák vizsgálatuk tárgyát nem képezik, így a teljesen ismeretlen összetételű környezeti minták esetében ezek az eredmények legjobban esetben is csak jó kiindulópontot jelenthetnek a T-RFLP vizsgálatok megtervezéséhez. Ebből adódóan minden esetben fontos a kiválasztott primer-enzim kombinációk empirikus ellenőrzése. A modellrendszerünkben a legfontosabb szempont az enzimek megválasztásánál az volt, hogy az egyes baktérium törzsek úgy váljanak el egymástól az elektroferogramon, hogy az T-RF csúcsok magasság és csúcs alatti terület értékeit megbízhatóan detektálhassuk.

Az enzimválasztás demonstrálására bemutatjuk, hogy milyen okokból zártunk ki bizonyos enzimeket a rendelkezésünkre állók közül az *in silico* vizsgálatok során:

¹⁹ A molekulásúly függ az adott fluoreszcens jelölés és a DNS szekvencia purin tartalmától. A minta és a belső standard eltérő jelöléséből eredő TRF elcsúszást egyes gyártók szoftvere automatikusan kiegyenlíti (Kaplan és Kitts, 2003).

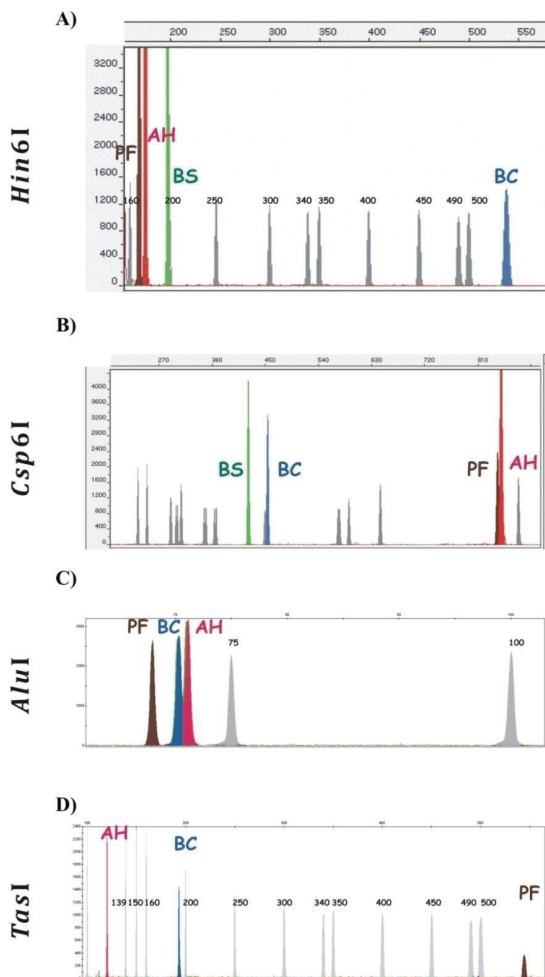
²⁰ Átlagban az OTU-k 70%-át sikerült 4 bp felismerő helyű restrikciós enzimekkel elválasztani, amikor az OTU-k száma a modellközösségben 50 volt. Bizonyított tény, hogy több enzim alkalmazásával jóval hatékonyabb az OTU-k elválasztása egy közösségen belül (Engebretson és Moyer, 2003).

- a **BsuRI** enzimet az AH és PF törzsek esetében a 63F primer kötőhelyén belül hasított, és a BC és BS törzseket sem választotta el megfelelően.
- a **Bsh1236I** a *Bacillus cereus* és *Bacillus subtilis* törzseket nem választotta el (2bp különbség a 200-250 bp tartományban).
- **AluI** enzim túlságosan rövid T-RF-eket eredményezett a 63F primerrel (37-41 bp).

A pontos fragmentumhossz meghatározást a mintákkal együtt futó belső molekulásúly standard teszi lehetővé. A kapilláris elektroforézis felbontása a fragmentumok méretével romlik, ami az elválasztott csúcsok alapi szélesedéseként jelentkezik az elektroferogramokon, és jól követhető a 21/D ábrán aTAMRA-500 belső standard csúcsainál. Olyan enzimeket kellett keresnünk, amelyek mind a négy törzset jól elválasztják mindkét általunk vizsgált primerpárral. A CGE módszer minden bizonnyal alkalmas 1 bázispár hosszkülönbség elválasztására, amint azt a 21/C ábra mutatja. Azonban a görbe alatti területek arányának egészen precíz meghatározásához olyan csúcsokra volt szükségünk, amelyek alapjuknál nem érnek össze, ami ebben az esetben csak az AH-PF csúcsoknál teljesült.

A kiválasztott enzimek közül a *Hin6I*, a *Csp6I* és a *TasI* enzimek használatával mindegyik törzs TRF-je egy mintán belül is jól elkülöníthető volt (21. ábra).

- a **TasI** enzimnél csak a *star activity* jelensége okozott problémát (lásd IV.7. fejezet).
- a **Hin6I**: a TAMRA-500-standarddal együtt jól használható; igaz a BS esetében nem tud pontosan méretezést adni, de csúcsa közel esik a mérettartomány felső határához (542 bp hosszú, 21/A ábra) és jól értékelhetőek a csúcshoz tartozó adatok.
- **ACsp6I** enzimmel mind a négy törzs csúcsai jól elkülönülnek egymástól, azonban az AH és PF esetében a T-RF-ek 800 bp feletti hosszúsága miatt a TAMRA-500-as belső standardot nem lehetett használni. Megoldást jelenthetett volna a TAMRA-1000 vagy a TAMRA-2500-as standardok futtatása, azonban ezek a belső standardok 550 bp feletti tartományokban csak nem-denaturáló körülmények között alkalmazhatóak (ABI, 2000; Engebretson és Moyer, 2003). Ennél is nagyobb problémát okozott, hogy a hosszban egymástól 8 bp-ban különböző (19. táblázat) – elméletileg jól elkülöníthető – T-RF-ek ebben a mérettartományban az alapjuknál már egybeesősztek. Ezért statisztikailag megbízhatóan értékelhető adatokat ezeknél a csúcsoknál nem kaphattunk (21/B ábra, 63F primerpár esetében AH: 850 bp és PF: 842 bp). Jól látszik, hogy *Hin6I* enzim esetében az ugyancsak 8 bp-ban különböző, azonban a *Csp6I* enzimnél kapottaknál jóval rövidebb T-RF fragmentumok (21/A ábra, 63F primerpár esetében AH: 178 bp és PF: 170 bp) teljesen szétválnak.



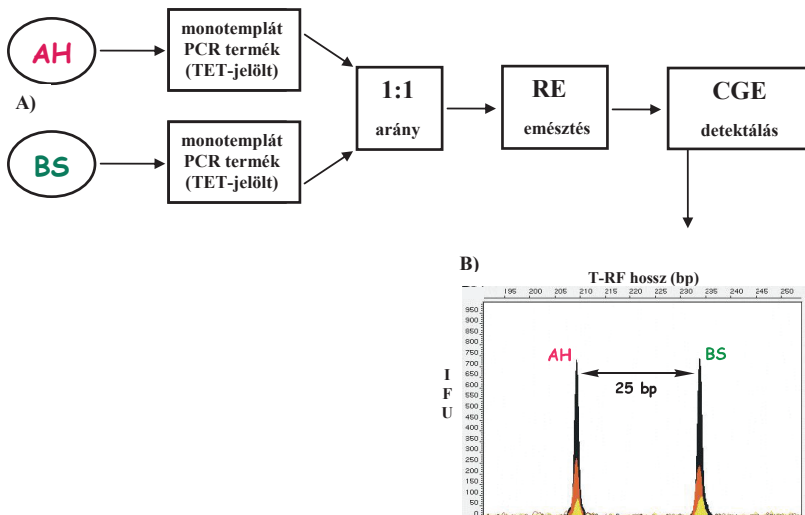
21. ábra. A modellrendszert alkotó négy törzs TET-jelölt terminális fragmentumainak elválasztása kapillaris gél elektroforézissel. A törzsek jelölése: **AH** (*Aeromonas hydrophila*, piros), **BC** (*Bacillus cereus*, kék), **BS** (*Bacillus subtilis*, zöld) és **PF** (*Pseudomonas fluorescens*, barna). A csúcsok színezése utólag CorelDRAW v12.0 szoftverrel készült.

A) T-RFLP elektroferogram TET-63F-1387R primerpárral felszaporított amplitonokkal és *Hin6I* restriktációs enzimmel **B)** TET-63F-1387R primerpárral és *Csp6I* restriktációs enzimmel **C)** TET-27F-1387R primerpárral és *AluI* restriktációs enzimmel **D)** TET-27F-1387R primerpárral és *TasI* restriktációs enzimmel. A elektroferogram szürke csúcsai a TAMRA-500 belső méret standard (A, C és D) és a TAMRA-2500 belső méret standard (B) adott méretű fragmentumai.

V.2.c A restrikciós emésztés és a CGE elválasztás megbízhatóságának tesztelése

Ellenőriztük a modelltörzsek elválasztását a kísérleti rendszerünknek megfelelően, azonban szükséges volt meghatározniuk – a PCR termék összetételének vizsgálatához –, hogy az általunk használt kvantitatív detektálási T-RFLP módszer mennyire pontos és reprodukálható: a PCR termékek arányait milyen szórásértékek figyelembevételével tudjuk meghatározni egy adott primer-enzim kombinációban. Ennek ismerete elengedhetetlen ahhoz, hogy szignifikáns eltéréseken alapuló következtetéseket tehesünk a multitemplát PCR termék összetételének változásaira.

A T-RFLP detektálás érzékenységét és reprodukálhatóságát monotemplát PCR termékek 1:1 arányú keverékeivel teszteltük. A törzsekből külön-külön nyert és tisztított monotemplát PCR termékek koncentrációját meghatároztuk, és ezeket 1-1 arányban csak a restrikciós emésztés előtt kevertük össze (22. ábra).



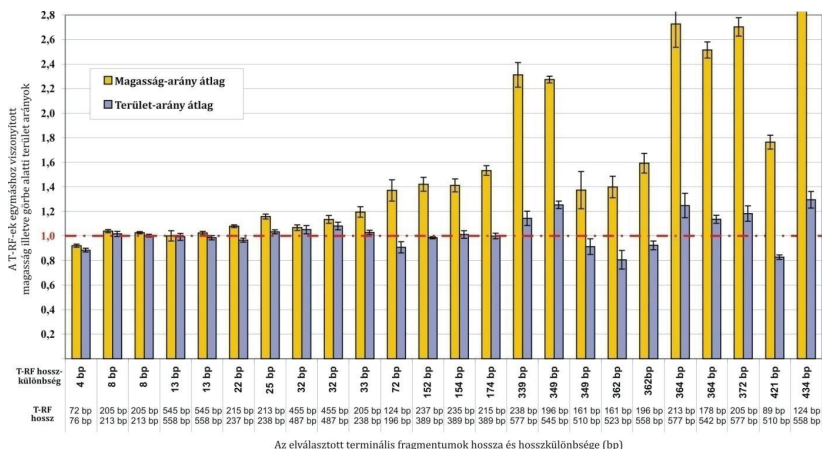
22. ábra. A PCR termék arányok T-RFLP detektálási módszer pontosságának ellenőrzése.

A) Vázlat a monotemplát PCR termékek 1:1 koncentrációjú keverékének emésztésére és kapilláris gél-elektroforetikus elválasztására. **B)** Az *Aeromonas hydrophila* és *Bacillus subtilis* monotemplát PCR termékek (TET-27F-1387R) 1:1 arányú keverékének *Hin*6I restrikciós emésztéséből nyert terminális fragmentumok együttes detektálása kapilláris gél-elektroforézissel hígítatlan (fekete), 5x-os (narancssárga) és 10x-es hígításokban (citromsárga). IFU=fluoreszcens intenzitás egység; T-RF= terminális restrikciós fragmentum

A 22/B ábrán ugyanannak az emésztésnek a különböző hígításaiból (1x, 5x és 10x) létrejött elektroferogramjait vetítettük egymásra, így jól összevethető a T-RF-ek

detektálásának pontos reprodukálhatósága, amelyet környezeti minták komplexebb kromatogramjainál is bizonyítottak (Osborn *et al.*, 2000). A fent említett esetben a mesterségesen beállított 1:1 arányt a magasság, illetve a terület arányok is jól visszaadták.

Arra kerestük a választ, hogy melyik a T-RF csúcsokhoz tartozó adattal érdemes statisztikai kiértékelést végezni; a magasság, vagy a terület értékek mutatnak kisebb szórást az általunk felállított kísérleti rendszerben. Az irodalomban mind a mai napig nincsen egyértelmű állásfoglalás arról, hogy a magasság vagy a terület értékeket érdemes használni (Schütte *et al.*, 2008). Minden 1-1 koncentráció arányú PCR termék keverékből 3 párhuzamos mintát készítettünk. Az elektroferogramok kiértékelésénél a mintánként megjelenő 2 csúshoz tartozó magasság és görbe alatti terület értékekből kiszámoltuk a három párhuzamos futtatás átlagát és szórását. A két törzs egyedi T-RF-jeinek magasság és terület értékeiből hányadost képeztünk, konzekvensen mindig a rövidebb T-RF adatait osztottuk a hosszabb T-RF azonos értékével. Ideális esetben az 1-1 keverésekből a kromatogramok alapján az 1:1 arányt kellett volna visszakapnunk; tehát mind a magasság, mind a terület arányok esetében 1-es hányadost vártunk (23. ábra).



23. ábra. Különböző hosszúságú terminális fragmentumok páronkénti magasság és terület aránya.

Tiszított monotemplát PCR termékeket a restrikciós endonukleáz emésztés előtt 1:1 koncentráció arányban mértük össze. A detektált T-RFLP csúcsok magasság és terület arányait ábrázoltuk úgy, hogy a rövidebb fragmentum adatát osztottuk el a hosszabb fragmentum értékével. Minden adatot szlop 3 párhuzamos PCR reakció 3 párhuzamos T-RFLP futás átlagát és szórását jelöli. A kapott hányadosoknak a teoretikus 1,0 értéket kell közelítenie, amelyet a diagramon piros szaggatott vonallal jelöltünk. A T-RF-ek *in silico* hosszúság értékeihez tartozó modelltorzsek és restrikciós enzim kombinációk a 19. táblázat alapján azonosíthatók.

A megbízhatósági méréseinkhez minden lehetséges primer-enzim kombinációt kipróbáltunk, és ezzel a teljes hossz-különbség tartományt lefedtük. Bizonyos esetekben nagy pontossággal, elfogadható szórás értékekkel ($1 \pm 0,10$) lehetett reprodukálni az eredeti 1:1 koncentráció arányokat, amely a 22/B ábra kromatogramján jól kivehető. Azonban a különböző primer-enzim kombinációk rávilágítottak a módszer használhatóságának korlátaira. Tapasztalatainkat az alábbiakban foglalhatjuk össze:

- Amennyiben az elválasztott csúcsok magasság és terület arányait a két fragmentum hossz-különbségének függvényében ábrázoltuk, egyértelműen látszott, hogy a magasság arányok számottevően eltértek a mesterségesen beállított 1:1 aránytól, amikor az elválasztott T-RF csúcsok méretben jelentősen különböztek egymástól ($\Delta TRF > 50$ bp). A terület arányok ugyanezekben az esetekben jóval pontosabb közelítést adtak.
- Az eredetileg beállított koncentráció arányoktól való eltérés mértéke (definíció szerint a méréseink hibahatára) annál nagyobb volt, minél távolabb estek egymástól az elválasztott csúcsok; ugyanakkor nem függött az elválasztott T-RF-ek tényleges hosszától (23. ábra, PF: 545 bp és BS: 558 bp csúcsok elválasztása $S.D. = \pm 0,02$). A detektálás megbízhatósága (ellentétben a *TRF drift*-tel) nem mérettartomány, hanem méretkülönbség függő.
- A magassági adatok alapján számított hányadosok az eredeti értéktől való egyre nagyobb mértékű eltérése a CGE felbontás hosszfüggő romlásával, a hosszabb fragmentumok csúcseinak ellaposodásával magyarázható. Ebből következik, hogy az általunk kidolgozott rendszerben és alkalmazott körülmények mellett egy mikroba közösség elemzésnél a csúcsok kiértékeléséhez a görbe alatti területekkel ajánlott számolni (Sipos *et al.*, 2007).
- Eredményeikkel ellentétben Lueders és Friedrich (Lueders és Friedrich, 2003) illetve Osborn is (Osborn *et al.*, 2000) a csúcsmagasságok használatát javasolták. Ők azonban kísérleteiket nem kapilláris gél-elektroforézissel, hanem szekvenáló-gélen végezték.

V.2.d Összegzés

Az AH, BC és PF törzsek tisztított monotemplát PCR termékét 1:1:1 arányban kevertük össze az emésztés előtt, és a keveréket *AluI* és *TasI* RE enzimekkel külön elegendőben emésztettük (21/C és 21/D ábrák). Az említett elektroferogramok segítségével bizonyíthatjuk általában a T-RFLP módszer, és egészen pontosan az általunk használt modellrendszer pontosságát, és nagyon jól szemléltethetünk bizonyos elválasztási és kiértékelhetőségi problematikákat.

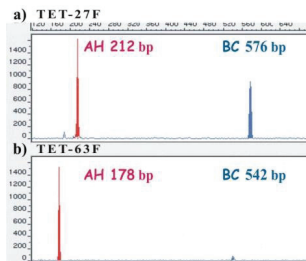
- Az egyes törzsekből kapott terminális fragmentumok **1 bp** különbséggel elválasztható csúcsokat eredményezhetnek (21/C ábra).
- A legnagyobb mértékű **T-RF drift** a <100 bp alatti tartományban mutatkozik (kb. -4,5 bp illetve 5,5 bp) (21/C ábra). (illetve az >500 bp feletti tartományban, de nem áll rendelkezésünkre megfelelő standard, hogy ezt pontos értékekkel is alátámaszthassuk a denaturáló közegben elválasztott hosszabb fragmentumok méretmeghatározás problematikája miatt)
- **Kis hosszkülönbség** ($\Delta TRF > 50$ bp) esetén a magasság és a görbe alatti területek aránya is egyaránt jó mérőszáma a fragmentumok relatív abundancia arányának (21/C ábra).
- **Nagyobb hosszkülönbség** esetén azonban egyre rosszabb pontossággal használható a T-RF-ek magasság értéke (21/D ábra). A görbe alatti területek aránya is egyre jobban tér el a beállított értéktől, de a terület értékek még mindig jóval pontosabb közelítést adják az 1-es hányadosnak, mint a magasság értékek. Egyértelműen látszik, hogy a terület arányok használhatóak az aránytorzulások pontos meghatározásához, ezért további részletesebb vizsgálataink kiértékelésénél már **csak a görbe alatti területekkel** számoltunk.
- A módszer megbízhatóságára végzett vizsgálataink eredményei ellentmondanak egyes irodalmi hivatkozásoknak, amelyek a csúcsok magassága mellett érvelnek, és felhívják a figyelmet a **kísérleti körülmények meghatározó jelentőségére** (készülék, elválasztási technika, fluoreszcens jelölés, szoftver, algoritmus). Csak az azonos paraméterekkel futtatott minták eredményeit szabad biztonságosan összehasonlítani.
- A részletes statisztikai feldolgozásoknál mindig egy **adott törzs-primer-enzim kombinációra** vonatkoztatva határozhatunk meg mérési hibahatárt, vagy korrekciós faktort. A modellrendszer egészét nem lehet egy értékkel, hanem csak egy mérési megbízhatósági tartománnyal jellemezni (pl. görbe alatti területek használata esetén $S.D. = \pm 0,02-0,25$).

V.3 A multitemplát PCR paramétereinek vizsgálata

V.3.a Az primer illeszkedési hiba (mismatch) hatása

Miután meghatároztuk a kísérleti rendszerünk pontosságát, a multitemplát PCR vizsgálatához mesterséges templátként a modelltörzsekből izolált genomi DNS keverékét használtuk. Előkísérleteket végeztünk, amelyben a törzsekből kivont genomi DNS-eket minden lehetséges kombinációban, és különböző mesterségesen beállított koncentráció arányokban használtuk fel. Minden templát keverék esetében a 27F és 63F primerpárokkal is elvégeztük a PCR reakciókat. Az adatfeltárási vizsgálatok során a genomi DNS-ek összemérését nemcsak 1-1, hanem 1-10 illetve 1-50 arányokban is megvizsgáltuk. Hiába kaptunk azonban a kísérleti beállításokból a kromatogramokon látványos eredményeket, mivel a domináns T-RF csúcsok magassága a jól detektálható tartományon kívülre esett, az adatok statisztikai kiértékelésre gyakran alkalmatlannak bizonyultak. Mivel a PCR összetételét befolyásoló hatások helyenként drámai különbségeket eredményeztek, az egyszerűség kedvéért inkább az 1:1 arányú összeméréseket preferáltuk.

Az előzetes vizsgálatok eredményei egyértelműen arról árulkodtak, hogy az eredetileg beállított templát arányok legnagyobb mértékű megváltozása a PCR során alkalmazott primerek különbségéből fakadt. Ezt szemlélteti a 24. ábra, amely ugyanazon templát keverékből (AH-BC) előállított PCR termék összetételének változását mutatja a PCR során használt primerpárok függvényében. Természetesen a két törzs genomi tulajdonságai jelentősen befolyásolhatták a PCR kimenetelét (21. táblázat) – az egyes törzsek 16S rRNS génszakaszainak eltérő hatékonyságú felszaporítását – a primer különbség jóval markánsabb eltéréseket eredményezett.



24. ábra. Az adatfeltárási vizsgálatok során az AH és BC törzsek genomi DNS-ének 1:1 koncentráció arányú keverékéből különböző primerpárokkal előállított PCR termék T-RFLP analízise. A genomi DNS-t a TET-27F-1387R (a) és a TET-63F-1387R primerpárokkal (b) szaporítottuk fel és a restrikciós emésztés *Hin*6I enzimmel történt.

Feltételeztük, hogy a jelenség hátterében a primerek és a célszekvenciák törzsenként eltérő pontosságú illeszkedése állhat. Tüzetesen megvizsgáltuk az általunk használt primerek és a modellrendszert alkotó törzsek primerkötő helyének bázissorrendjét (20. táblázat). A 27F és a 1387R primerek a négy törzs célszekvenciájával szemben minden esetben tökéletes illeszkedést mutattak. A 63F primer azonban az 5' véghez közelebb mindkét *Bacillus* törzzsel szemben három illeszkedési hibával rendelkezik. Marchesi és mtsai (1998) a primer leírásakor ugyan megemlítették, hogy a 63F primer számos *Bacteria* csoport esetében illeszkedési problémát okoz (akár 3-8 *mismatch*); azonban a primert a kérdéses baktérium törzseken egyenként tesztelték, és minden esetben sikeres PCR-t értek el, így nem tulajdonítottak különösebb jelentőséget az illeszkedési hibáknak. A modellrendszerünkben a primer választásból adódó nagyon markáns különbségek azonban teljesen összhangban álltak a törzsek 63F primerrel szemben mutatott illeszkedési hibáival (24. ábra és 20. táblázat). Amennyiben BC vagy BS templátot kevertünk 1:10 arányban AH vagy PF DNS-ekkel, a 63F primerpárral készült PCR termékben a *Bacillus* T-RF csúcsokat nem tudtuk detektálni (feltehetően a pontosan illeszkedő célszekvencia preferenciális amplifikációja miatt).

20. Táblázat. Az "univerzális" 16S rRNS génre specifikus primerek (27F, 63F és 1387R) illeszkedése a modell kísérletekben használt négy baktériumtörzs célszekvenciájával szemben.

TET-27F primer	5'	A	G	A	G	T	T	T	G	A	T	C	M [*]	T	G	G	C	T	C	A	G	3'	
AH	5'	A	G	A	G	T	T	T	T	G	A	T	C	C	T	G	G	C	T	C	A	G	3'
BC	5'	A	G	A	G	T	T	T	T	G	A	T	C	C	T	G	G	C	T	C	A	G	3'
BS	5'	A	G	A	G	T	T	T	T	G	A	T	C	C	T	G	G	C	T	C	A	G	3'
PF	5'	A	G	A	G	T	T	T	T	G	A	T	C	C	T	G	G	C	T	C	A	G	3'
TET-63F primer	5'	C	A	G	G	C	C	T	A	A	C	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'
AH	5'	C	A	G	G	C	C	T	A	A	C	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'
BC [†]	5'	C	G	T	G	C	C	T	A	A	T	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'
BS	5'	C	G	T	G	C	C	T	A	A	T	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'
PF	5'	C	A	G	G	C	C	T	A	A	C	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'
1387R primer	3'	C	G	G	A	A	C	A	T	G	T	G	W [*]	G	G	C	G	G	G	5'			
AH	5'	G	C	C	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	C	3'			
BC	5'	G	C	C	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	C	3'			
BS	5'	G	C	C	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	C	3'			
PF	5'	G	C	C	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	C	3'			

AH: *Aeromonas hydrophila*; BC: *Bacillus cereus*; BS: *Bacillus subtilis*; PF: *Pseudomonas fluorescens*.

*M=A/C, W=A/T. †A 63F primeren belül szürke háttérrel jelöltük azokat a nukleotid pozíciókat, amelyek illeszkedési hibát tartalmaznak a *Bacillus cereus* és a *Bacillus subtilis* célszekvenciákkal szemben. A 27F és 1387R primerek mind a négy törzs célszekvenciájához tökéletes illeszkedést mutattak (100%-os illeszkedés).

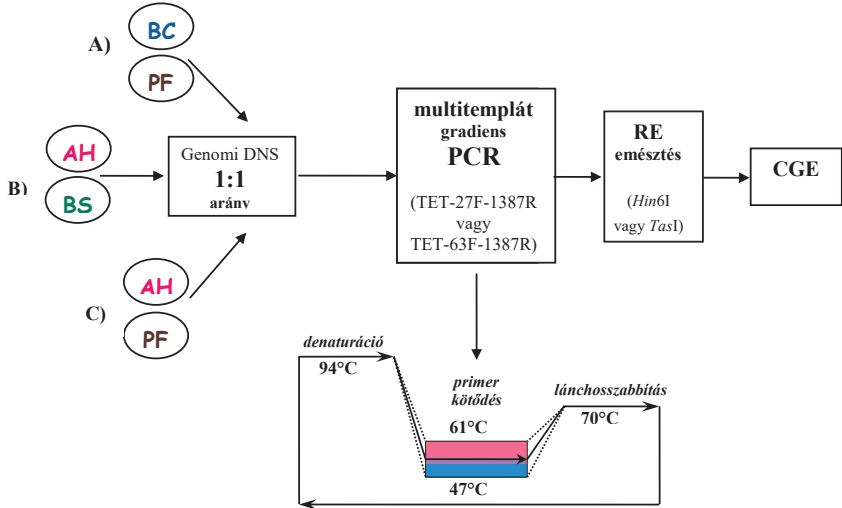
Hipotézisünket, hogy a primerek és a célszekvenciák között fellépő illeszkedési hibák jelentősen befolyásolják a modellrendszerben a multitemplát PCR templát-termék arányait, és ezzel egyes baktériumokból származó génszakaszokat preferenciálisan amplifikálnak, a továbbiakban célzottan vizsgáltuk. A kísérleteinket minden esetben négy párhuzamos templát összemérésből, egyenként három elektroforetikus futásból végeztük, hogy egy adott kísérleti

beállításban statisztikailag szignifikáns különbségeket tudunk kimutatni. A lehető legegyszerűbb kísérletet próbáltuk felállítani, hiszen akár csak két genomi DNS-ből álló templát esetén is rengeteg tényezőt kell figyelembe venni, amelyek a templát-termék arányokat befolyásolhatják (genomméret, *rnn* operon szám, G+C arány, illeszkedés hibák stb.). Ezért a részletes vizsgálatainkat kizárólag két törzsből álló genomi DNS templátokon végeztük. A törzskombinációkat az alapján osztályoztuk, hogy a 63F primerrel való amplifikáció során megnyilvánul-e a három illeszkedési hiba („**torzított felállás**”: AH-BC, AH-BS, PF-BC és PF-BS) vagy sem („**nem-torzított felállás**”: AH-PF és BC-BS). A pontos aránytorzulások meghatározásához csak a jól méretezhető T-RF csúcsot adó enzim-primer kombinációkat alkalmaztuk, hogy az eredményekből helytálló következtetéseket tudjunk levonni.

V.3.b Az annelációs hőmérséklet változtatásának hatása

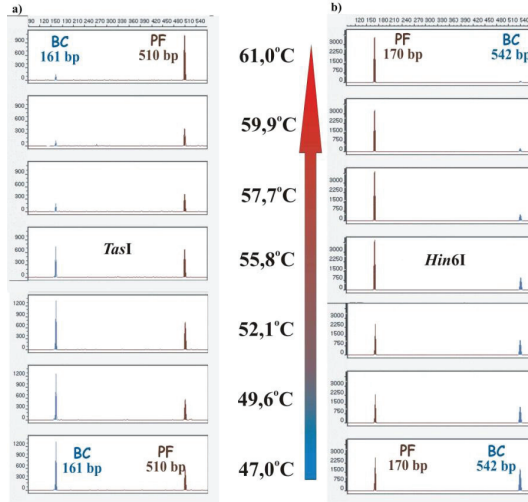
Egy PCR reakció sikerének és specifikusságának kulcsa a primer és a célszekvencia közötti hibridizáció hatékonysága/eredményessége. A puffer közeg kémiai összetétele, a Mg^{2+} és oligonukleotid koncentrációk, illetve az annelációs hőmérséklet megváltoztatásával befolyásolhatjuk a primer-templát kötődést (Markoulatos *et al.*, 2002). A PCR optimalizáció legfontosabb tényezője ezek közül az annelációs hőmérséklet, amit egy PCR készülék segítségével egyszerűen lehet változtatni és szabályozni. Vizsgáltuk az illeszkedési hibák által okozott templát-termék aránymódosulások mértékét az annelációs hőmérséklet függvényében; különböző torzított illetve nem-torzított kiindulási felállásban (25. ábra). A törzsekből izolált genomi DNS-eket a PCR előtt páronként 1:1 arányban kevertük és a PCR során a primer kötődési hőmérsékletet széles tartományban változtattuk (47°C–61°C között).

A PF és BC törzsek genomi DNS 1:1 arányú keveréke esetében a PCR termékek terminális fragmentumainak elválasztását a 63F primerpár esetében a 26. ábra elektroferogramjain követhetjük nyomon. A csúcsok magasságából is egyértelműen látszik, hogy a PF törzs genomi DNS-ét a BC-vel szemben a 63F primerpár preferencialisan szaporította fel. Az eredeti templát-arányhoz képest a PF a PCR termékben nagyobb abundanciát eredményezett, amit két különböző enzimmal kapott eredmények is alátámasztottak. A *Hin*6I és *Tas*I enzimekkel történő restriktációs emésztés érdekessége, hogy a PF-BC párosításban az enzimek közel azonos hosszkülönbségű T-RF-eket eredményeztek (372 bp illetve 349 bp), viszont az egyes törzsekhez tartozó T-RF csúcsok migrációs sorrendje a két enzimmal fordított volt (26. ábra).



25. ábra. Az illeszkedési hibák hatása az annealációs hőmérséklet függvényében.

A 63F primerrel szemben illeszkedési hibát tartalmazó „torzított felállás” (A: BC-PF és B: AH-BS) és illeszkedési hibát nem tartalmazó („nem-torzított felállás” C: AH-PF) törzs kombinációk vizsgálatának vázlata. A gradiens PCR során az annealációs hőmérsékletet a 47°C–61°C tartományon belül változtattuk. Az összes párosításnál a genomi DNS 1:1 koncentráció arányt három párhuzamos összemérésben végeztük.

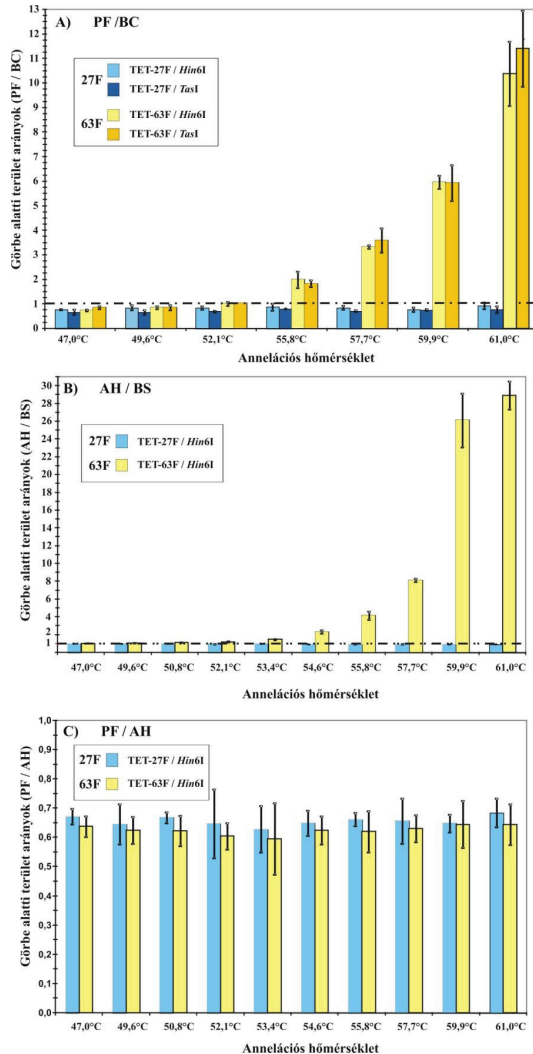


26. ábra. A BC és PF törzsek genomi DNS-ének 1:1 arányú keverékéből TET-63F-1387R primerpárral előállított gradiens PCR termék összetételének elemzése T-RFLP módszerrel. a) A gradiens PCR 47°C–61°C tartományban, a restriktációs emésztés *TasI* enzimmel történt. b) A gradiens PCR 47°C–61°C tartományban, a restriktációs emésztés *Hin6I* enzimmel történt.

A kapilláris gélelektroforézis felbontóképességéből adódó hibát ezáltal korrigálhattuk, ugyanis a görbe alatti területarányok számításánál konzekvensen mindig a PF csúcsok értékeit viszonyítottuk a BC csúcsokhoz (27/A ábra). Az eredeti 1:1 aránytól való eltérés az annelációs hőmérséklettel majdnem exponenciálisan nőtt. Ebből az összefüggésből adódóan a magasabb annelációs hőmérsékleteken (59,9°C és 61°C) az illeszkedési hibával rendelkező mérések szórása magas értékeket eredményezett, mivel az elválasztott csúcsok görbe alatti területei egyre nagyobb különbséget mutattak, és gyakran az egészen alacsony csúcsok (BC) a detektálhatósági küszöb határán mozogtak. Kisebb hőmérsékleteken a preferenciális amplifikáció sokkal kisebb mértékben mutatkozott.

A 27F és 63F primerpárokkal kapott területarányokat együtt ábrázolva az is kiderül, hogy a mindkét törzsre nézve pontos illeszkedést adó 27F primerpár nem okozott jelentős preferenciális amplifikációt. Azonban meg kell említenünk, hogy sem a kisebb hőmérsékletű torzított felállás, sem a nem torzított felállás nem adta vissza az rRNS operon gyakorisági adatokból számolt arányokat (21. táblázat). Ezt sokan tapasztalták, és más primertől független tényezőknek tulajdonították [pl. *rrn* operon elrendeződés (Farrelly *et al.*, 1995); vagy egyéb a templát rRNS génszakaszon kívüli hatások (Hansen *et al.*, 1998)]. Mindenesetre, ha összehasonlítjuk az illeszkedési hibával terhelt 63F primerpár és a 27F primerpárral kapott eredményeket, megbizonyosodhatunk, hogy az illeszkedési hibából származó hatás jóval szignifikánsabb, mint a genomi tulajdonságok különbségéből adódó hatás (27/A ábra).

Az előbbi példához hasonlóan a torzított felállású **AH és BS** törzsek genomi DNS 1:1 arányú keveréke esetén szintén megfigyelhettük az annelációs hőmérséklet és a 63F primerpárral kapott területarányok majdnem exponenciális összefüggését (27/B ábra). Ebben a kísérletben nagy pontossággal detektálhattuk az eredeti templát arányok módosulását a PCR során. Ezt az a tette lehetővé, hogy a *Hin6I* enzimmel a két törzsből nyert T-RF csúcs mindössze 25 bp hosszúságban különbözött, így 5%-os szórással reprodukálhattuk az eredeti koncentráció arányokat (22/B ábra). A pontosan illeszkedő 27F primerpár esetében a mérési hibahatárnál nagyobb eltéréseket a templát-termék arányokban egyik hőmérsékleten sem tapasztaltunk. Az egyre kisebb hőmérsékleteken a 63F primerpárral kapott területarányok az eredetileg beállított templát koncentráció arányokhoz közelítettek. A 27F alkalmazásával a legkisebb hőmérsékleten (47°C) sem mutatkozott a PCR termék arányaiban negatív hatás. Az irodalmi adatok alapján mindkét törzs hasonló operon gyakorisággal rendelkezik (0,86-1,07 operon gyakoriság arány; 21. táblázat), ami a 27F primerrel kapott eredményekben tükröződött, mivel a két legnagyobb hőmérséklet kivételével a terület arányok hibahatáron belül 0,96 értéket adtak.



27. ábra. A terminális fragmentumok görbe alatti terület arányai a TET-27F-1387R és a TET-63F-1387R primerekkel előállított PCR termékekben.

A) *Pseudomonas fluorescens* és *Bacillus cereus* 1-1 koncentrációarányú genomi DNS templátból különböző annelációs hőmérsékleteken végzett PCR összetétele, minden esetben a PF csúcs terület értékét viszonyítottuk a BC csúcs terület értékéhez. B) *Aeromonas hydrophila* és *Bacillus subtilis* 1-1 koncentrációarányú genomi DNS templátból különböző annelációs hőmérsékleteken végzett PCR összetétele, minden esetben az AH csúcs terület értékét viszonyítottuk a BS csúcs terület értékéhez. C) *Pseudomonas fluorescens* és *Aeromonas hydrophila* 1-1 koncentrációarányú genomi DNS templátból különböző annelációs hőmérsékleteken végzett PCR összetétele, minden esetben a PF csúcs terület értékét viszonyítottuk az AH csúcs terület értékéhez.

21. Táblázat. A modellrendszerben szereplő fajok genom méretre és rRNS operon számra vonatkozó adatai.

	operon szám	genomméret (10 ⁶ bp)	operon gyakoriság (operon/10 ⁶ bp)	operon gyakoriság arányok [*]			
				AH	BC	BS	PF
AH	10	4,50	2,22	1,00	0,92-1,00	0,94-1,17	2,95
BC	12-13	5,40-5,41	2,22-2,40	1,00-1,08	1,00	0,93-1,27	2,94-3,19
BS	8-10	4,21	1,90-2,38	0,86-1,07	0,79-1,07	1,00	2,52-3,15
PF	5	6,63	0,75	0,34	0,31-0,34	0,32-0,40	1,00

^{*} A *Ribosomal RNA Operon Copy Number Database* [rrndb (Klappenbach *et al.*, 2001)] adatbázisban található törzsek genom adatai alapján számított elméleti operon gyakoriság arányok. AH, *Aeromonas hydrophila*; BC, *Bacillus cereus*; BS, *Bacillus subtilis*; PF, *Pseudomonas fluorescens*.

Az illeszkedési hiba hatásának vizsgálatához megfelelő kontrollként szolgál a mindkét primerpárral szemben pontos illeszkedést mutató **PF és AH** törzsek genom DNS-ének 1:1 arányú elegye (27/C ábra). Egyértelműen látszik, hogy az annelációs hőmérséklet növelésével egyik forward primer esetében sem figyelhető meg trendszerű változás a PCR termék arányában, azonban a csúcsok terület arányai szignifikánsan eltérnek az 1:1 aránytól. Az eltérés iránya tükrözi a genomai különbségeket, azonban mértéke – hasonlóan a PF és BC felálláshoz – ez esetben sem egyezik meg az elméletileg számolt értékekkel (0,34 operon gyakoriság arány; 21. táblázat). Fontos megjegyezni, hogy a genomméret és operon szám adatok csak a BC törzsünk esetében ismertek pontosan, a többi törzsnél az adott fajra, de nem a konkrét törzsrre vonatkozó adatokkal tudunk számolni a rendelkezésre álló adatbázis alapján (Klappenbach *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2009). Természetesen a templát-termék aránymódosulások mértékében más genomai tulajdonságok is szerepet játszhattak (pl. G+C arány, operon elrendeződés). A vizsgált annelációs hőmérséklet tartományon belül semmilyen összefüggést nem lehetett megállapítani az annelációs hőmérséklet és a T-RF csúcsok területarányai között az AH és PF felállásban.

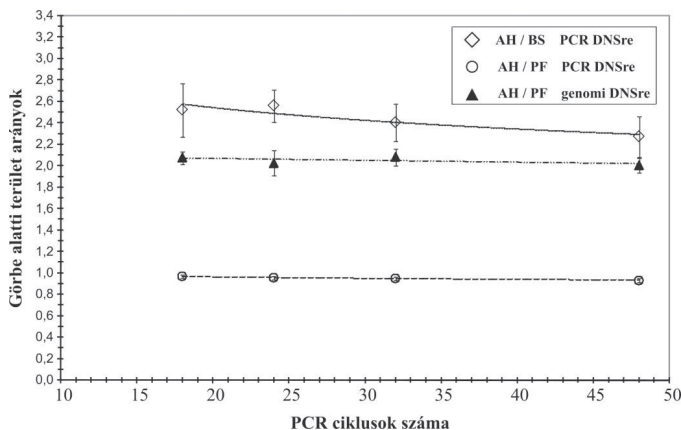
Az annelációs hőmérséklet preferenciális amplifikációra gyakorolt hatását korábban Ishii és Fukui is vizsgálta (Ishii és Fukui, 2001), azonban az általuk alkalmazott módszer (DGGE) érzékenysége messze elmaradt az általunk használt T-RFLP módszerétől. A DGGE módszer nem szemi-quantitatív, így semmilyen szinten nem volt alkalmas az esetleges preferenciális amplifikáció és az annelációs hőmérséklet között fennálló összefüggés leírására, illetve fenntartásokkal kellett kezelni a nem azonos mennyiségben felvitt DNS-ek DGGE gélkép alapján történő mennyiségi összehasonlítását is (Sekiguchi *et al.*, 2001; Kisand és Wikner, 2003; Nikolausz *et al.*, 2005). Hongoh és mtsai (2003) természetes bélmikrobiótáját vizsgálta különböző „univerzális” primerek (többek között a 27F és 63F primerek) alkalmazásával, 16SrDNS klónkönyvtárak elemzésével. Minden vizsgált primer esetében megerősítették, hogy az annelációs hőmérséklet csökkentésével a detektálható filotípusok száma nőtt. A 63F primer alkalmazásakor bizonyos csoportok (pl. *Spirochaeta*, lásd 19. ábra) alulreprezentáltságát tapasztalták, amelyet egyértelműen a nagy számú primer illeszkedési

hibából eredő torzítással magyaráztak (6-8 illeszkedési hiba). Azonban egyik esetben sem tudták a mennyiségi viszonyok változásának pontos mértékét megállapítani. A modellrendszerrel kapott eredményeinkkel kísérletet tettünk a korreláció leírására, továbbá kiemeltük, hogy az ismertetett három illeszkedési hibából adódó preferenciális amplifikáció mértéke csökkenthető, és bizonyos alacsony annelációs hőmérsékleten megközelítheti a pontos illeszkedésű primerrel kapott értékeket. Feltételezhetjük, hogy a megfelelően alacsony annelációs hőmérséklet alkalmazása megfelelő lehet egy vagy két mismatch hatásának kompenzálására is.

V.3.c A PCR ciklusszám változtatásának hatása

A PCR ciklusszámának hatását a multitemplát PCR templát-termék aránymódosulásaira, különös hangsúllyal az illeszkedési hibák által okozott hatásokra vizsgáltuk. Az előbbi kísérletekhez hasonlóan, itt is mesterségesen állítottuk be a modelltörzsekből származó DNS templát 1:1 koncentráció arányokat. A vizsgálatainkat öt különböző ciklusszámmal végeztük (12, 18, 24, 32 és 48 ciklus), azonban a 12 ciklushoz tartozó görbe alatti terület értékek egyes esetekben nagyon nagy szórást eredményeztek, majd a későbbi környezeti minták vizsgálatánál csak igen gyenge erősségű PCR terméket sikerült előállítani (12/C ábra); így végül a 12 ciklushoz tartozó adatokat nem vettük figyelembe az eredmények kiértékelésénél.

A genomi tulajdonságok erősen befolyásolták a templát-termék aránymódosulásokat, amikor genomi DNS-ek szolgálták kiindulási templátként (28. ábra, AH és PF genomi DNS). A genomi tulajdonságok figyelembe vétele már a korábbi, annelációs hőmérséklet vizsgálatok kapcsán is problematikusnak mutatkozott; és természetesen ezeknek a paramétereknek a tekintetbe vétele környezeti minták mikrobiális közössége esetében szinte teljes mértékben lehetetlen. A nem tenyésztett törzsek esetében a genomi tulajdonságok nem állnak rendelkezésre, és a meglévő adatbázisok, bár folyamatosan bővülnek, csak kevés számú tenyésztett törzs genomjára szorítkoznak (Lee *et al.*, 2009). Jelen vizsgálatunkkal meg akartuk határozni, hogy az illeszkedési hibáknak tulajdonítható torzulásokat miként befolyásolja a PCR ciklusszámának változása. Ennek meghatározása érdekében a genomi tulajdonságok hatását szándékosan kiiktattuk kísérleteinkből azáltal, hogy templátként nem a törzsek genomi DNS-ét, hanem a belőlük előállított monotemplát PCR termékeket (27F-1492R) 1:1 koncentráció arányát használtuk. A multitemplát PCR templátok így tartalmazták a 63F és az 1387R primerek kötőhelyeit, amely terméket a második, „*nested*” lépésben szaporítottunk. A 63F primerpár és a különböző ciklusszámok esetében ismételtlen egy torzított (AH-BS) és egy nem-torzított (AH-PF) beállítás eredményét ismertetjük (28. ábra). A reakcióhoz egy olyan annelációs hőmérsékletet választottunk (54°C), amelynél korábbi kísérleteink során markáns templát-termék aránymódosulás mutatkozott a pontosan illeszkedő törzs javára (27/B ábra).

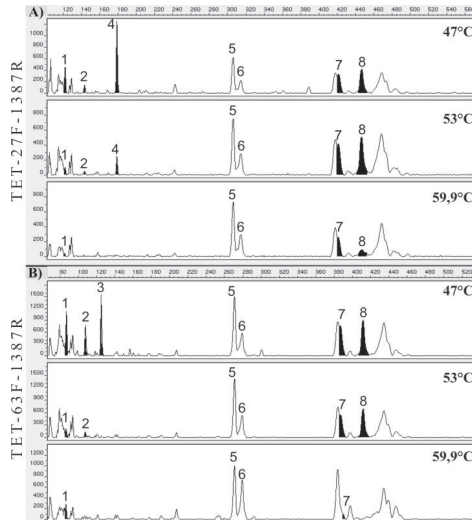


28. ábra. A ciklusszám hatása az AH / BS illetve az AH / PF párok T-RF csúcsainak terület arányaira különböző típusú és összetételű kiindulási DNS templátok esetében. A PCR szaporításhoz a **TET-63F–1387R** primerpárt és 54°C-os annelációs hőmérsékletet használtunk, illetve 18, 24, 32 és 48 ciklust. Amikor PCR terméket használtunk templátként, a törzsekből előállított 27F–1492R tisztított PCR termékek mértük össze 1:1 koncentráció arányban (minden esetben 4 párhuzamos összemérésben és 3 párhuzamos PCR reakcióban).

A PCR ciklusszám változásának hatása csak elenyésző mértékben jelentkezett a PCR templát-termék arányok módosulásában, habár az illeszkedési hiba hatása mindvégig nagyon erősen megmutatkozott. Az **AH-BS** beállítás esetében kis mértékben csökkent a pontos illeszkedést mutató AH törzs aránya, de a nagy szórásértékek miatt ez nem adódott szignifikáns különbségnek (28. ábra AH-BS PCR; $p > 0,05$). A nem-torzított **AH-PF** összemérésnél nagyon jól látható, hogy a beállított koncentrációt (1:1) a 48 ciklus kivételével minden PCR ciklus esetében mérési hibahatáron belül visszakaptuk a PCR termékekben (28. ábra AH-PF genomi).

V.4 Modellrendszer eredményeinek tesztelése környezeti mintákon

A PCR paraméterek templát-termék aránymódosulásának vizsgálatával olyan ajánlások megfogalmazása volt a célunk, amelyeket a környezeti minták molekuláris módszerekkel történő feldolgozása során arra használhatunk fel, hogy minimalizáljuk a PCR lépés során fellépő aránytorzulásokat. A modellrendszerrel kapott eredményeinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy a preferenciális amplifikáció mérséklése érdekében az annelációs hőmérsékletet kis értéken kell tartani, hiszen a legalacsonyabb hőmérsékletek alkalmazásával nem tapasztaltuk a törzsekkel beállított templát arányok jelentős módosulását. A hipotézisünket egy gyékény rizoszféra mintán teszteltük a modellrendszerünkben használt mindkét primerpárral, és különböző annelációs hőmérséklet alkalmazásával. A közösségi mintázatokat T-RFLP kromatogramok alapján hasonlítottuk össze (29. ábra).



29. ábra. Az annealációs hőmérséklet hatása egy gyékény rizozszféra (TypRS) közösség T-RFLP mintázatára.

A) TET-27F-1387R primerpárral és *Csp6I* restriktációs enzimmel. **B)** TET-63F-1387R primerpárral és *Csp6I* restriktációs enzimmel. A 63F primerpárral nyert elektroferogramokat 35 bázispárral eltöltük, hogy a két primerpárral kapott mintázatokat össze lehessen hasonlítani. A szövegben hivatkozott T-RF csúcsokat fekete kitöltéssel és számokkal jelöltük.

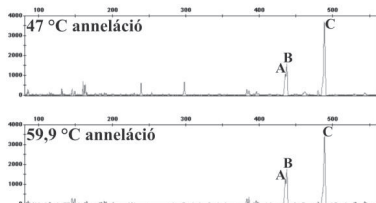
Az annealációs hőmérséklet csökkenésével mindkét primer esetében egy összetettebb, komplexebb közösségi mintázatot kaptunk, mivel kisebb hőmérsékleten új csúcsok jelentek meg, amelyek egyáltalán nem, vagy csak nagyon kis mennyiségben voltak jelen a specifikusabb, nagyobb hőmérsékletű PCR termék T-RFLP mintázatában (29. ábra). Alapvetően a két primerrel kapott mintázat nagyon hasonló, többségében ugyanolyan T-RF-eket eredményez; azonban amint ez várható, mindkét esetben találtunk olyan domináns T-RF csúcsot, amelyet csak az egyik primerpár ujjlenyomat mintázatában volt jelen (3-as csúcs csak 63F primerpárral, a 4-es csúcs kizárólag a 27F primerpárral jelentkezett).²¹ Az elektroferogramokon is egyértelműen látható, hogy a diverzitás az annealációs hőmérséklet emelésével fordított arányban változik. A közösség összetételéről kapott képünk megváltozása ott a legszembevetőbb, ahol a nagyobb hőmérsékleten bizonyos csúcsok teljesen eltűnnek a közösségi mintázatból. Ilyen eltűnő T-RF-ek a 27F primerpár esetében a 2-es és 4-es, valamint a 63F primerpár esetében a 2-es, 3-as és 8-as csúcsok (29. ábra). Az annealációs hőmérséklet hatására olyan csúcsok relatív abundanciája is megváltozik, amelyek

²¹ Természetesen csupán az elektroferogramok alapján nem lehet egyértelműen megállapítani, hogy a két primerpárral 35 bp különbséggel kapott T-RF csúcsok minden esetben ugyanabból a filospécieszből származnak, de ezt az elhanyagolást ebben az esetben megtettük.

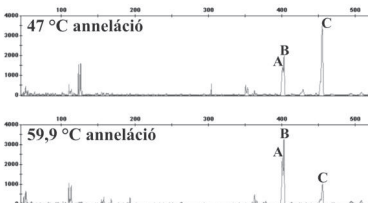
konzekvensen mindkét primerpárral és minden hőmérsékleten detektálhatóak (1-es, 7-es és 8-as csúcsok). Ilyen relatív abundancia eltolódások jelentős mértékben befolyásolják egy adott közösség dominancia viszonyairól egyetlen kromatogram alapján nyert következtetéseinket.

Természetesen az annelációs hőmérséklet hatása egy primerpár esetében mindig erősen mintafüggő, jelentős eltéréseket mutathat nagyon és kevésbé diverz mikrobiális közösségek esetében. A közösségi T-RFLP elemzésekben tapasztaltakat behatóan egy (a rizoszféra mintához képest kevésbé diverz) gyékény rizoplán mintán (Typ-RP) tanulmányoztuk. Párhuzamosan a ciklusszám és az annelációs hőmérséklet hatását vizsgáltuk ugyanazon a közösségi genomi DNS mintán (30. ábra).

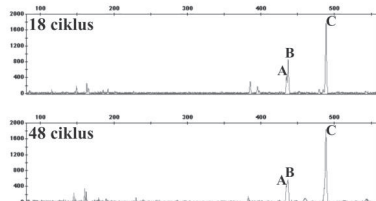
A) TET-27F



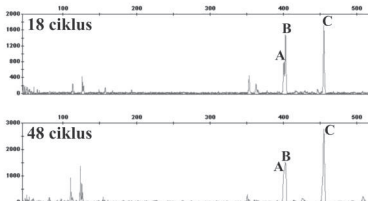
C) TET-63F



B) TET-27F



D) TET-63F



30. ábra. A PCR paraméterek változtatásának hatása egy gyékény rizoplán közösség T-RFLP mintázatára.

Az **annelációs hőmérséklet** hatása a különböző primerpárokkal kapott mintázatra, kisebb és nagyobb hőmérsékleteken (A és C); a **PCR ciklusszám** hatása a különböző primerpárokkal kapott mintázatra a legkevesebb és legtöbb ciklus esetében (B és D); TET-27F-1387R primerpárral és *MspI* restrikciós enzimmel (A és B); TET-63F-1387R primerpárral és *MspI* restrikciós enzimmel (C és D). A kromatogramokon betűvel jelzett csúcsok görbe alatti terület arányát a 22. táblázat tartalmazza.

Az elektroferogramok mennyiségi kiértékelésének összehasonlításához az egyes T-RFLP futásokat közel azonos görbe alatti összfluoreszcencia értékre standardizáltuk. A különböző PCR paraméterekhez tartozó mintázatok mennyiségi összevetéséhez a Shannon diverzitás indexet használtuk; a relatív abundancia arányok változásának szemléltetésére pedig három az ábrán jól látható A, B és C-jelzésű csúcs egymáshoz viszonyított arányait határoztuk meg, amely adatokat a 22. táblázat tartalmazza.

22. Táblázat. Egy gyékény rizoplán minta (Typ-RP) mikroba közösségének különböző PCR paraméterek alkalmazásával nyert T-RFLP elemzésének eredménye.

primer-pár	annelési hőmérséklet	PCR ciklusszám	T-RF csúcsok	Shannon index (H)	(A+B)/C* terület arány
27F	47.0 °C	32	71.5±14.8	1.19±0.06	0.57±0.02
	50.9 °C	32	65.0±7.1	1.06±0.04	0.56±0.02
	55.3 °C	32	58.0±1.4	0.99±0.01	0.60±0.03
	59.9 °C	32	49.0±5.7	0.94±0.01	0.67±0.04
63F	47.0 °C	32	83.0±1.4	1.31±0.01	0.71±0.01
	50.9 °C	32	75.5±13.4	1.21±0.08	0.78±0.04
	55.3 °C	32	72.5±8.7	1.17±0.03	1.38±0.13
	59.9 °C	32	70.7±4.0	1.34±0.05	3.89±0.19
27F	52.0 °C	18	19.0±2.6	0.89±0.02	0.73±0.02
	52.0 °C	24	22.0±1.4	0.93±0.00	0.82±0.02
	52.0 °C	32	24.7±5.5	0.87±0.05	0.67±0.01
	52.0 °C	48	30.7±7.8	0.91±0.07	0.55±0.04
63F	52.0 °C	18	30.0±1.7	1.04±0.02	1.26±0.02
	52.0 °C	24	26.8±4.3	1.02±0.02	1.40±0.06
	52.0 °C	32	33.0±2.1	1.07±0.03	1.03±0.05
	52.0 °C	48	26.5±0.7	1.03±0.03	0.83±0.03

*A 30. ábrán látható kromatogramokon betűvel jelzett csúcsok görbe alatti terület arányai. Az A és B jelzésű csúcsok terület értékeit az egyszerűség kedvéért egyesítettük, mivel 48 PCR ciklus alkalmazásakor a csúcsokat nem lehetett pontosan elválasztani.

Az annelési hőmérséklet emelkedésével a T-RFLP csúcsok száma mindkét primerpár esetében csökkenést mutatott, ezzel egy kevésbé összetett közösséget jelezve (22. táblázat). Ez ellentmond Osborn és mtsai (2000) által kapott eredményeknek, akik az annelési hőmérséklet növelésével több T-RF-et detektáltak. Ők azonban mindössze két hőmérsékleten és csak egy primerpárral (Osborn *et al.*, 2000) vizsgálták a kötődési hőmérséklet hatását, és a terminális fragmentumokat nem kapilláris gél-elektroforézissel választották el. Mindenesetre azzal érveltek, hogy kisebb hőmérsékleteken többféle szekvencia amplifikálódik, ezek kisebb mennyiségben lesznek jelen, így egyes T-RF-ek a detektálhatósági határ miatt a közösségből nem mutathatók ki. Az általunk kapott eredményeket, miszerint mindkét primerpárral egyértelműen több T-RF csúcsot detektáltunk kisebb hőmérsékleteken, az automatizált mintafelvétel, a kapilláris elválasztás nagyobb precizitása és az újabb detektálási rendszer nagyobb dinamika tartománya magyarázhatja. Kisebb annelési hőmérsékleten új csúcsok megjelenése mellett a csúcsok által reprezentált amplikonok relatív gyakorisága is megváltozott, amelyet legjobban a 30. ábrán jelölt A, B és C csúcsok görbe alatti terület arányaival szemléltethetünk. Míg a 27F primerpár esetében nem figyelhető meg szignifikáns változás, a 63F primerpárral a nagyobb hőmérsékleteken (55,3°C és 59,9°C) a C csúcs relatív aránya erősen lecsökkent ($p>0,05$). A két primer közti eltérés arra utal, hogy a rizoplán közösségen belül a C csúcs relatív abundanciájának csökkenésében a 63F primer esetén fellépő illeszkedési hibák játszhattak közre. A Shannon diverzitás index mindkét primer esetében csökkent a hőmérséklet növelésével, csak 59,9°C-on a 63F primerpár mutatott

kismértékű növekedést, ami a C csúcs nagyarányú relatív görbe alatti terület csökkenésével magyarázható. A környezeti minták vizsgálata megerősítette a korábban a modellrendszerben tapasztalt eredményeinket és bizonyította, hogy az annelációs hőmérséklet emelésével a detektálható bakteriális diverzitás csökken.

A ciklusszám vizsgálata során a 27F primerpárral a csúcsok száma a ciklusszám növelésével kis mértékben nőtt (de nem adott szignifikáns különbséget), míg a 63F primerpár esetében ilyen összefüggést nem tapasztaltunk. A Shannon indexek viszont egyik esetben sem változtak a PCR ciklusok számának növekedésével. Osborn és mtsai (2000) nagyobb PCR ciklusszámok alkalmazásával diverzebb T-RFLP mintázatot kaptak, amit kísérleteink nem támasztottak alá. Eredményeink azt a véleményt erősítik, hogy a molekuláris ujjlenyomat módszerekkel kapott mintázatok diverzitás becslésére alkalmasabbak a diverzitás indexek, mint önmagukban a csúcs, vagy a csíkszámok (Saikaly *et al.*, 2005; Loisel *et al.*, 2006). Kísérleteink nem erősítették meg a Suzuki és Giovannoni (1996) által tapasztalt ciklusszám-függő torzítást; amely szerint az egyre nagyobb számban keletkező domináns amplikonok re-annelációja, a primer-templát hibridek kialakulását a PCR ciklusszámának függvényében egyre nagyobb mértékben gátolta volna. Eredményeink több kutatócsoporttal összhangban (Lueders és Friedrich, 2003; Acinas *et al.*, 2005) azt igazolták, hogy diverz környezeti minták esetében még igen nagy PCR ciklusszámok alkalmazása mellett is elenyésző volt a ciklusszám hatása. Mindenesetre extrém nagy PCR ciklusok használata továbbra sem javasolt a különböző PCR melléktermékek (Qiu *et al.*, 2001): szekvencia kimérák (Wang és Wang, 1997), heteroduplex és egyszálú DNS molekulák (Jensen és Straus, 1993) képződése miatt.

A kötődési hőmérséklet változása mintatípusonként eltérő hatást gyakorolhat a T-RFLP ujjlenyomat mintázatok szerkezetére, ami természetesen adódik az univerzális primerek különböző amplifikációs hatékonyságából. A 63F primerrel minden esetben nagyobb diverzitást detektáltunk ugyanabban a gyékény rizoplán mintában, mint a 27F primerpárral (22. táblázat). Ez összhangban van Marchesi és mtsai (1998) által tapasztaltakkal, miszerint a 63F-1387R primerpár különböző típusú környezeti mintákon alkalmazva, a többi primernél jobb PCR hatékonyságról tett tanúbizonyságot, amit azonban nem tudtak pontosan megmagyarázni. Feltételezték, hogy a jelenség hátterében a különböző 16S rRNS génterületeknek eltérő hibridizációs potenciálja állhat; illetve rávilágítottak, hogy a 27F primer intramolekuláris duplexet alkothat, ami a *Taq* 5'→3' exonukleáz aktivitása miatt az 5' vég rövidülésével és egyben az olvadási hőmérsékletek megváltozásával járhat, ami okozhatja a gyengébb PCR hozamot (Marchesi *et al.*, 1998). Saját laboratóriumi tapasztalatunk is az, hogy a 63F primerrel (több reverz primerrel kombinálva is) nagyobb PCR hozamot tudtunk elérni, mint más 16S rRNS gén primerekkel; illetve nehezen amplifikálható minták esetében gyakran csak ezzel a primerrel tudtunk sikeres amplifikációt

elérni. Ezzel magyarázható, hogy a primert az ismert illeszkedési hibák ellenére is széles körben alkalmazzák.

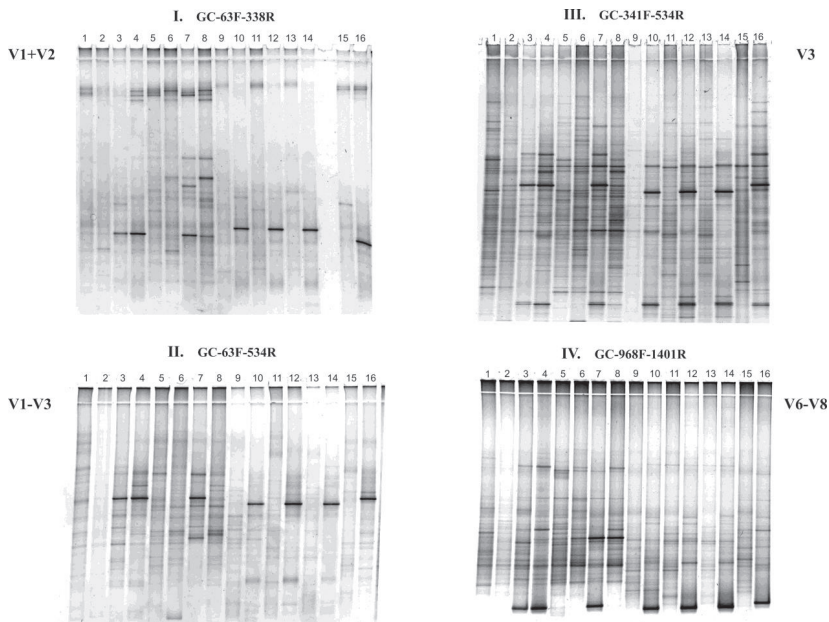
V.4.a Összegzés

- A modellrendszerben beállított templát arányok legnagyobb mértékű megváltozása a PCR során alkalmazott primerek különbségéből fakadt. A 63F primer esetén megnyilvánuló három illeszkedési hiba hatását vizsgáltuk két eltérő törzskombináció esetén; kontrollként pedig egy illeszkedési hibát nem tartalmazó törzskombináció, illetve a 27F primerrel végzett kísérletek szolgáltak (27. ábra). Igazoltuk, hogy minden törzskombináció esetén a primer és a célszekvencia között fellépő három illeszkedési hiba a tökéletes illeszkedést mutató templát igen nagymértékű preferenciális amplifikációját okozta.
- Közismert, hogy minden fajhoz tökéletesen illeszkedő univerzális 16S rRNS primereket lehetetlenség tervezni (Baker *et al.*, 2003; Forney *et al.*, 2004); azonban a modellrendszerben nyert eredményeink azt igazolják, hogy a legjelentősebb templát-termék aránymódosulások a primerek illeszkedési hibáiból adódtak, amelyek a közösségről alkotott képet jelentősen torzítják. Ezért nagyon fontos azoknak a PCR paramétereknek a beható ismerete és figyelembevétele, amellyel a primer illeszkedési hibákból adódó, multitemplát PCR jellegéből fakadó preferenciális amplifikáció hatását csökkenteni lehet.
- Az illeszkedési hibák hatására megnyilvánuló templát-termék arányok módosulását az annelációs hőmérséklet függvényében modellrendszerben vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy az eredeti aránytól való eltérés az annelációs hőmérséklettel majdnem exponenciálisan nőtt (27. ábra). Tapasztaltuk, hogy az illeszkedési hibából származó hatás jóval jelentősebb volt, mint a genomi tulajdonságok különbségéből adódó hatás.
- A modellrendszerben a PCR ciklusszám változásának hatása csak kis mértékben jelentkezett a PCR templát-termék arányok módosulásában, azonban az illeszkedési hibából eredő torzulás mindvégig erősen megmutatkozott.
- A környezeti minták T-RFLP vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy mindkét primerpár esetében az annelációs hőmérséklet emelésével a detektálható bakteriális diverzitás csökkent. Jelentősen módosultak a T-RF csúcsok egymáshoz viszonyított arányai, sőt magas hőmérsékleten bizonyos csúcsok teljesen eltűntek az elektroferogramokról. A csúcsok arányainak módosulása eltérő mértékű volt a vizsgált két primerpár esetében, amelyben a modellrendszerben tapasztalt illeszkedési problémákhoz hasonló hatások valószínűsíthetőek.
- A ciklusszám vizsgálata egyik primerpár esetében sem igazolta a Suzuki és Giovannoni (1996) által tapasztalt ciklusszám-függő re-annelációs gátlást; amelyben szerepet játszhatott, hogy erősen diverz minták esetében feltehetően elenyésző a ciklusszám hatása.

V.5 Rizoszféra frakciók PCR-DGGE molekuláris „ujjlenyomata” a 16S rRNS gén különböző variábilis régióinak vizsgálatával

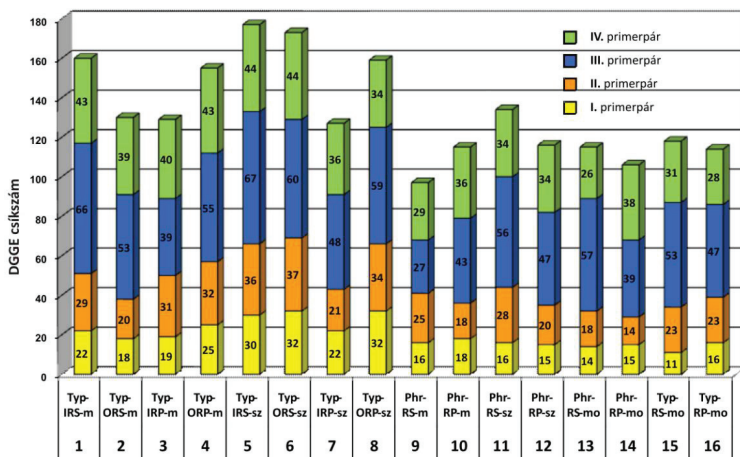
V.5.a A PCR-DGGE molekuláris „ujjlenyomatok” felbontása és általános elemzése

Mindegyik *Bacteria* domén specifikus primerpárral jól reprodukálható, és a talaj illetve rizoszféra mintákra általánosan jellemző komplex DGGE mintázatot (Griffiths *et al.*, 2003; Smalla *et al.*, 2007) kaptunk (31. ábra). Az ujjlenyomatok kiértékelésekor a mintánkénti átlag csíkszám magas volt ($33,2 \pm 5,8$). Az elektroforézis során minden esetben, megfelelő mértékben sikerült az amplikonokat elválasztani, a denaturáló PAA gél teljes terjedelmében. Az egyes minták sávjainak kismértékű háttér-festődésétől (*smear*) élesen elkülönülő, diszkrét csíkok mutatkoztak. A DGGE csíkok intenzitása közel azonos volt, csak egy-két markánsabb, ún. domináns csík jelentkezett többnyire a rizoplán minták esetében (31. ábra; a 3, 4, 7, 8 és 16-os Typ rizoplán minták; és a 10, 12 és 14-es Phr rizoplán minták). Korábbi futások alapján ezeket kloroplasztisz 16S rRNS gén szekvenciaként azonosítottunk. Ezen szekvenciák nagy aránya rizoplán minták elemzésekor problémát okoz (Nikolausz *et al.*, 2004).



31. ábra. A gyékény és nád rizoszféra frakciók DGGE ujjlenyomat mintázata négy különböző „univerzális” primerpárral, a 16S rRNS gén variábilis régióinak feltüntetésével. A 16 minta számozása azonos a 2. táblázatban foglaltakkal.

A DGGE csíkszám pontatlan, de alkalmazható mérőszáma a közösség domináns, nagy abundanciával jellemezhető csoportjai OTU gazdagságának (Muyzer és Smalla, 1998). A számos, közel azonos intenzitású csík előfordulása nagy mennyiségű, közel azonos gyakoriságú OTU jelenlétét feltételezi. A különböző univerzális primerpárokkal végzett DGGE elemzés eltérő felbontást eredményezett, ami nem mutatott összefüggést az elválasztott amplikonok hosszával, ezáltal megerősítette, hogy a PAA koncentráció a gélben mind a négy esetben a PCR termékek hosszának megfelelő volt. A két legrövidebb PCR termék a mintánkénti átlag csíkszám alapján éppen a szélső értékeket képviselte. A legkisebb átlag DGGE csíkszámot a GC-63-338R (I-es, 313 bp) primerpár eredményezte ($20,1 \pm 6,6$), a legnagyobbat pedig szemmel is láthatóan a GC-341F-534R (III-as, 194 bp) primerpár ($51 \pm 10,6$) (32. ábra).



32. ábra. A négy különböző primerpár (I-IV.) DGGE mintázatának elemzésével kapott csíkszámok. A mintázat elemzése a *TotalLab* gél-kiértékelő szoftver segítségével történt.

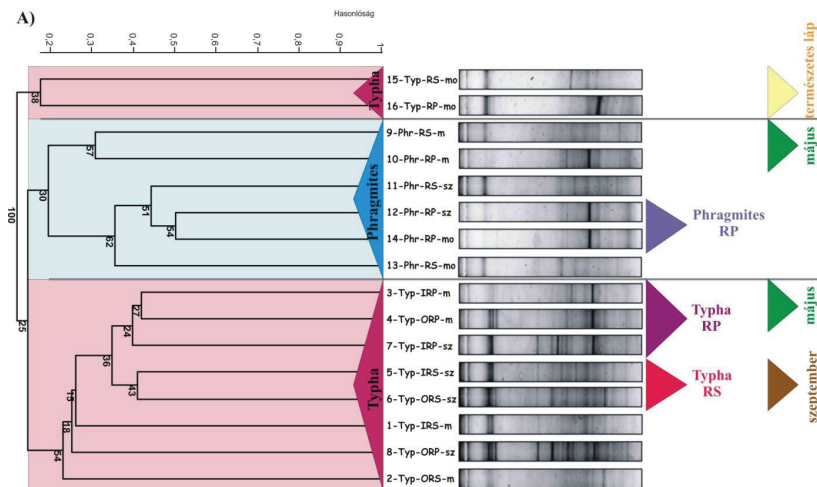
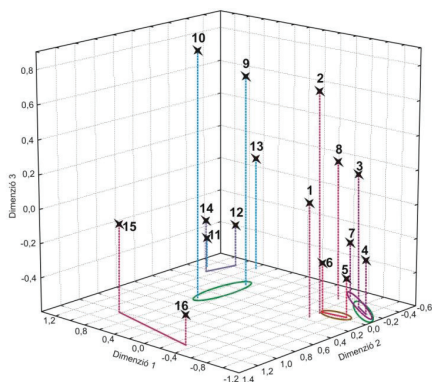
A *TotalLab* gél-kiértékelő szoftver a DGGE minták csíkjainak azonosítása és összehasonlítása során minden gél elemzésénél létrehoz egy mesterséges, ún. referencia sávot, ami az adott DGGE mintázatban előforduló csíkok összességéből áll, ami a négy primerpár esetében rendre 89, 107, 121 és 124 csíknak adódott. A létrehozott adatmátrix a referencia DGGE sáv csíkjainak mintánkénti meglétét illetve hiányát kódolja binárisan. A négy primerpár által kapott eredmények egyesítésével létrehoztunk egy ötödik adatsort, amely értelemszerűen a 16 mintára vonatkoztatva 441 DGGE csík adatát tartalmazta. A bináris mátrixok további feldolgozása statisztikai szoftvercsomagok segítségével hoztuk létre az adott

primerpár DGGE mintázatahoz tartozó UPGMA dendrogramot és háromdimenziós (3D) NMDS ábrát (33-37. ábrák).

A dendrogramokon és az NMDS ábrákon a minták tulajdonságait színekkel kódoltuk: a gyékény minták (Typ) pirosak, míg a nád minták (Phr) kékek. A rizoszféra frakciók színe gyékény esetében a piros különböző árnyalatainak, a nád esetében pedig kék árnyalatoknak felelnek meg. A mintavételi időpontok alapján a májusi minták zöldek, a szeptemberi minták barnák. Az eredeti élőhelyről származó mintákat (o) sárgával jelöltük. Az UPGMA dendrogramokon a minták jelölésére használt rövidítések azonosak a 2. táblázatban foglaltakkal. A minták jelölése mellett (jobbra) az adott minta DGGE ujjlenyomat sávja szerepel. A jobb átláthatóság kedvéért a dendrogramok bal oldalán a főbb csoportok elkülönülését és azok mintatulajdonsághoz köthető megfeleltetését színes négyszögekkel jelöltük (ahol releváns összefüggést tapasztaltunk). A jobb oldalon pedig a fő csoportokon belüli mintapárokat, kisebb klasztereket ábrázoltuk a megfelelő színű háromszögekkel. A vízszintes skála a minták egymáshoz viszonyított százalékos hasonlóságát mutatja.

A 3D NMDS ábrákon egy-egy minta egy pontnak felel meg a térben, a három koordinátatengely 3 dimenziónak feleltethető meg. Az egyszerűség kedvéért az egyes minták jelölésénél itt csak a sorszámokat tüntettük fel (32. ábra), az egyes mintapontok 2D felületre történő levetítésénél a dendrogramokban használt színkódolást alkalmaztuk. A kétféle statisztikai értékelés eredményét összehasonlítottuk, és a dendrogramokban előforduló, nagymértékű hasonlóságot mutató mintapárokat az NMDS ábrákon is jelöltük. Az adott mintapárokat vonalakkal kötöttük össze a kétdimenziós felületek egyikén (33. ábra; 12-14-es mintapár, amely az UPGMA dendrogramban 50%-os hasonlóságot mutatott, az NMDS ábra D1-D2 felületére levetítve, kék vonallal összekötve jelenik meg).

I. primerpár (GC-63F-338R)

**B)**

33. ábra. A GC-63F-338R primerpárral (I.) kapott DGGE ujjlenyomat mintázat statisztikai elemzése.

A 16 minta jelölése azonos a 2. táblázatban foglaltakkal. A gyékény mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit piros színnel, a nád mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit pedig kék színnel jelöltük. A mintavételi időpont alapján a májusi minták zöldek, a szeptemberi minták barnák. A telepítés helyéről származó, szennyvízzel nem érintkező minták sárgák. **A)** Hierarchikus osztályozás eredményeként 1000 ismétléssel létrehozott hasonlósági dendrogram (Jaccard index, UPGMA módszer), az elágazásokban a *bootstrap* értékeket is feltüntettük. A főcsoportokat a megfelelő színű téglalapok, a kisebb csoportokat háromszögek jelzik. **B)** Nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) eredményeként kapott háromdimenziós ábra (Jaccard index, stressz érték: 0,068). A 2D felületen a legnagyobb hasonlóságot mutató mintapárokat vonal köti össze, a kisebb csoportokat a megfelelő színű ellipszis jelzi.

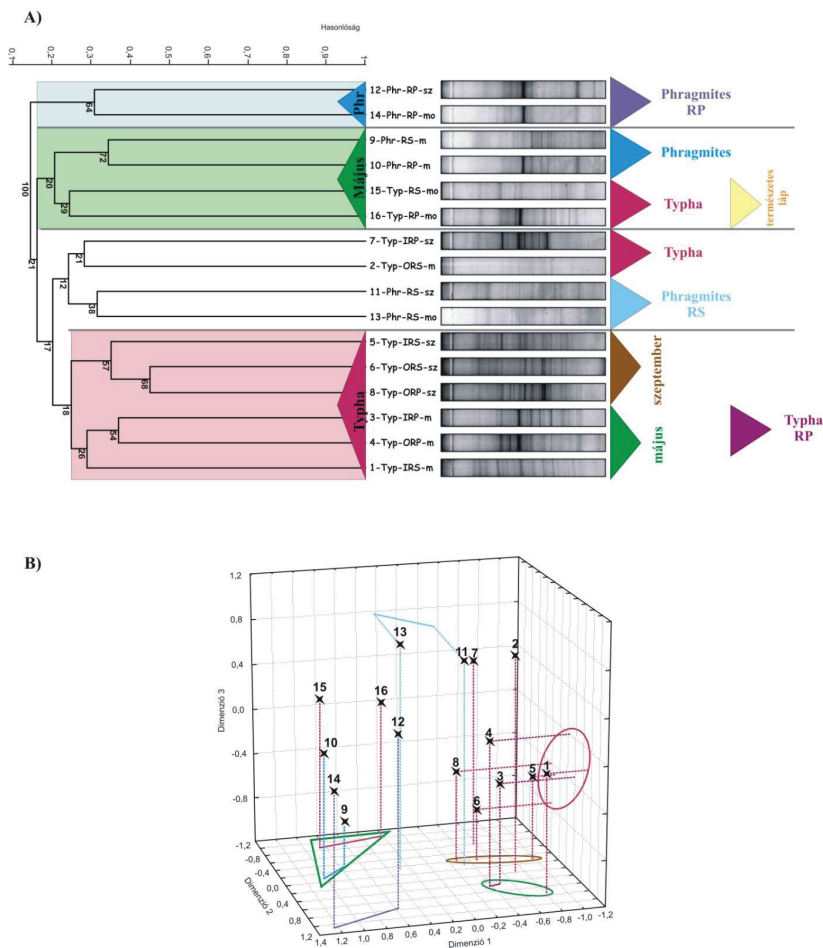
V.5.b Az egyenként elemzett DGGE mintázatok eredménye

A 33. ábra mutatja a V1+V2 hipervariábilis doméneket amplifikáló **I-es** primerpár (**GC-63F-338R**) DGGE mintázatának statisztikai értékelésével kapott UPGMA dendrogramot illetve NMDS ábrát. A dendrogramon három fő csoport különíthető el, és ezek a csoportok a mintákat a telepített növény (gyékény vagy nád) szerint csoportosítják. A nád minták egy nagy csoportot alkotnak (9-14), a gyékény minták pedig két klasztert: a mesterséges lápról származó, szennyvízzel érintkező minták (1-8) különálló csoportot alkotnak a telepítés helyéről származó mintáktól (15-16). Az NMDS ábra is mutatja a minták növény szerinti elkülönülését három klaszterre, illetve a telepítés helyéről származó gyékény minták egyértelmű különállását. A fő csoportokon belül egyes mintapárok megfigyelhetők voltak a különböző rizoszféra frakcióknak (3-4, 5-6, 12-14). A 3D ábrán látszik, hogy a nád mintákon belül a mintavétel időpontja szerint a harmadik dimenzió különíti el a 9-es és 10-es mintákat (zöld ovális). Hasonlóképpen szintén a harmadik dimenzió szeparálja az 1, 2, 8-as mintákat a gyékény csoporton belül. A gyékény 3-7 minták rizoszféra és rizoplán frakciókra válnak el, sőt ezek a frakciók még a mintavételi időpontoknak is megfeleltethetők (zöld és barna háromszög az UPGMA ábrán, illetve zöld és barna ovális az NMDS ábra D1-D2 felületén).

Az I-es primerpárral szemben, a V1-V3 hipervariábilis régiókat amplifikáló **II-es** primerpár (**GC-63F-534R**) DGGE ujjlenyomatának elemzésével nyert UPGMA dendrogram nem mutatja a minták növény szerinti szétválását (34. ábra). A főbb csoportok nem egy tulajdonság alapján válnak el, és nem is minden főcsoport feleltethető meg egy adott tulajdonságnak. A dendrogram alapján a minták 4 fő klaszterre különülnek el: a legnagyobb csoport gyékény mintákat, egy csoport kizárólag májusi mintákat, egy harmadik pedig nád mintákat (12 és 14) tartalmaz. A negyedik főcsoport (2, 7, 11 és 13 minták) elkülönülése semmilyen mintatulajdonsággal nem magyarázható, viszont az NMDS ábrán jól látható, hogy különállásuk a harmadik dimenzió értékeivel magyarázhatóak. A 3D ábrán jól szemléltethető, hogy a gyékény csoporton belül, a mintavételi időpontok szerint (május-szeptember) a minták két kisebb csoportra oszlanak (D1-D2 felületen zöld illetve barna oválissal jelölve).

Az I-es DGGE mintázat esetében a főbb csoportok elkülönülése jóval markánsabban mutatkozott, mint a GC-63F-534R primerpárral, és a gyékény minták másodlagosan növényi frakciók szerint és nem a szezonális alapján csoportosultak. A II-es primerpár esetében viszont a fő- és alcsoportok szétválásában is hangsúlyosabb szerepet játszott a minták szezonális megosztottsága.

II. primerpár (GC-63F-534R)



34. ábra. A GC-63F-534R primerpárral (II.) kapott DGGE ujjlenyomat mintázat statisztikai elemzése.

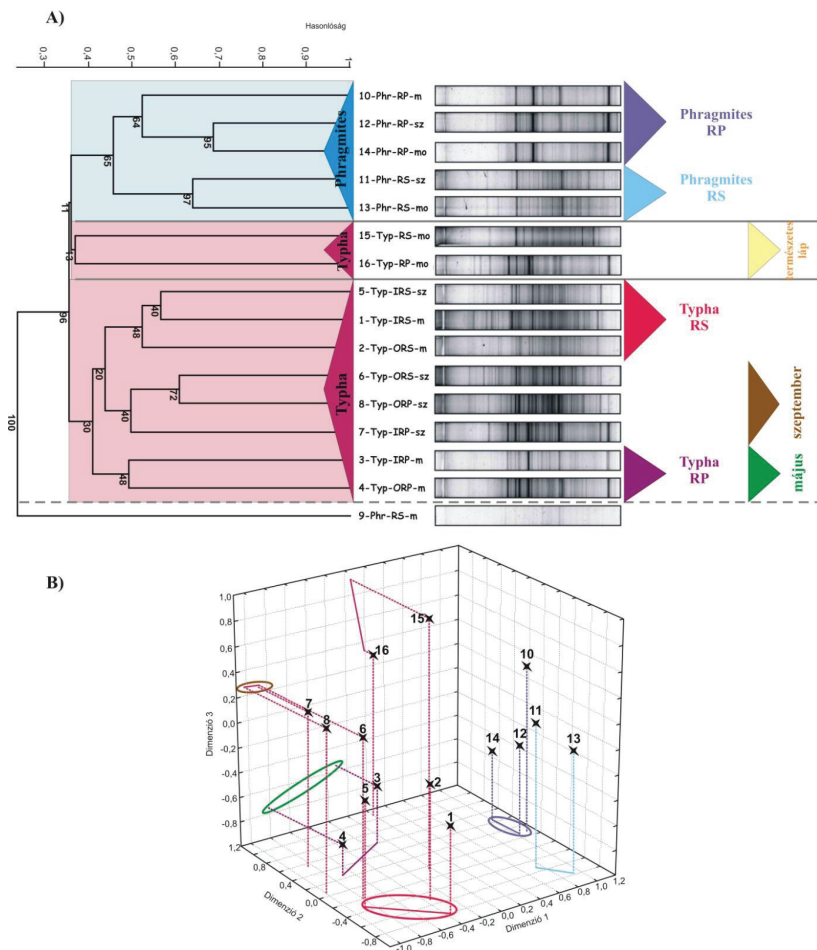
A 16 minta jelölése azonos a 2. táblázatban foglaltakkal. A gyékény mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit piros színnel, a nád mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit pedig kék színnel jelöltük. A mintavételi időpont alapján a májusi minták zöldek, a szeptemberi minták barnák. A telepítés helyéről származó, szennyvízzel nem érintkező minták sárgák. **A)** Hierarchikus osztályozás eredményeként 1000 ismétléssel létrehozott hasonlósági dendrogram (Jaccard index, UPGMA módszer), az elágazásokban a *bootstrap* értékeket is feltüntettük. A főcsoportokat a megfelelő színű téglalapok, a kisebb csoportokat háromszögek jelzik. **B)** Nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) eredményeként kapott háromdimenziós ábra (Jaccard index, stressz érték: 0,107). A 2D felületeken a legnagyobb hasonlóságot mutató mintapárokat vonal köti össze, a kisebb csoportokat a megfelelő színű ellipszis és háromszög jelzi.

Mikrobiális ökológiai vizsgálatokban az egyik leggyakrabban használt DGGE primerpár a **III-as** (GC-341F-534R), amely a V3 hipervariábilis régiót szaporítja fel (Muyzer *et al.*, 1993). A kapott DGGE megjelenés elemzése arra utal, hogy a gyékény és nád minták esetében ez a primerpár eredményezte a legnagyobb számú DGGE csíkot (OTU-t), feltételezve a legnagyobb mértékű bakteriális diverzitást. Azonban a 9-es számú minta a III-as primerpárral többszöri optimalizáció ellenére is gyenge PCR terméket eredményezett, ami a DGGE futás eredményeként kapott gélképen is látható (31. ábra). Ebből adódóan a hierarchikus osztályozás egyértelműen különálló mintaként (*outlier*) jelölte a 9-es mintát. Ezért ezt a mintát a további NMDS analízisből kihagytuk, mert nagymértékben torzította a minták hasonlóságából adódó távolságokat, és a minta elkülönülése értelemszerűen nem hordozott biológiai információt, hiszen különállása a többi mintánál jóval gyengébb PCR termék elektroforézisének az eredménye. A minták növény szerinti csoportosulása még az I-es primerpárnál is markánsabban jelentkezik, amelyet az UPGMA dendrogram és az NMDS ábra is jól szemléltet (35. ábra). Az NMDS ábrán a gyékény minták (piros, 1-8, 15 és 16) az első dimenzió szerint tisztán elválnak a nád mintáktól (kék, 10-14), és két élesen elkülönülő csoportot alkotnak. Ebben az esetben a növények szerinti csoportosulást az NMDS ábra jobban szemléltette az UPGMA dendrogramnál, amely 3 főklasztert különített el, megosztva ezzel a gyékény mintákat. A nád minták csoportján belül határozottan szétválnak a nád-rizoszféra és nád-rizoplán frakciók, amelyet a D2 dimenzió igazol. A gyékény klaszteren belül 3 rizoszféra mintát a D2 különített el (1, 2 és 5). A harmadik dimenzió alapján pedig a többi gyékény mintát lehetett a mintavétel ideje szerint csoportosítani májusi (3 és 4), illetve szeptemberi mintákra (6, 7 és 8).

A III-as primerpárral kapott hierarchikus osztályozás-, és NMDS ordináció alapján a főcsoportok szétválását, egyetlen tulajdonsággal, a növényi jelleggel lehetett magyarázni, és a főcsoportokon belül minden egyes alcsoport megfeleltethető volt valamely tulajdonságnak (rizoszféra frakció, szezonális vagy telepítés).

A **IV-es** primerpár (GC-968F-1401R) is egy széles körben, különböző 16S rRNS alapú mikrobiális vizsgálatokban alkalmazott DGGE primerpár (Nübel *et al.*, 1996), ami a V6-V8 hipervariábilis régiókat amplifikálja (10. ábra). A DGGE mintázatelemzés eredményeként a minták többnyire növényi jelleg szerint csoportosultak (36. ábra).

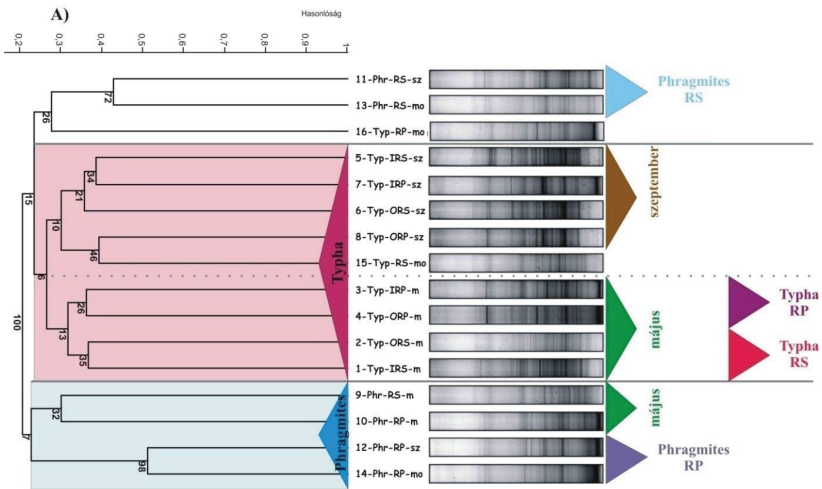
III. primerpár (GC-341F-534R)



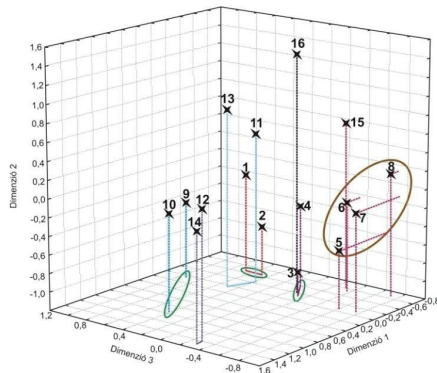
35. ábra. A GC-341F-534R primerpárral (III.) kapott DGGE ujjlenyomat mintázat statisztikai elemzése.

A 16 minta jelölése azonos a 2. táblázatban foglaltakkal. A gyékény mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit piros színnel, a nád mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit pedig kék színnel jelöltük. A mintavételi időpont alapján a májusi minták zöldek, a szeptemberi minták barnák. A telepítés helyéről származó, szennyvízzel nem érintkező minták sárgák. **A)** Hierarchikus osztályozás eredményeként 1000 ismétléssel létrehozott hasonlósági dendrogram (Jaccard index, UPGMA módszer), az elágazásokban a *bootstrap* értékeket is feltüntettük. A főcsoportokat a megfelelő színű téglalapok, a kisebb csoportokat háromszögek jelzik. **B)** Nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) eredményeként kapott háromdimenziós ábra (Jaccard index, stressz érték: 0,058). A 2D felületeken a legnagyobb hasonlóságot mutató mintapárokat vonal köti össze, a kisebb csoportokat a megfelelő színű ellipszis jelzi.

IV. primerpár (GC-968F-1401R)



B)



36. ábra. A GC-968F-1401R primerpárral (IV.) kapott DGGE ujjlenyomat mintázat statisztikai elemzése.

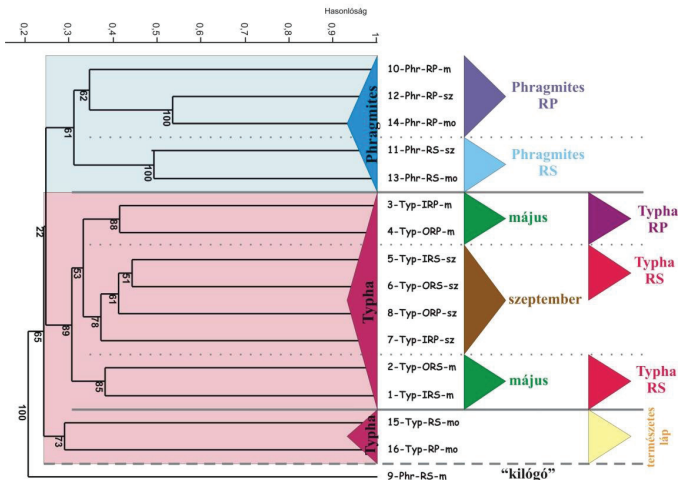
A 16 minta jelölése azonos a 2. táblázatban foglaltakkal. A gyékény mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit piros színnel, a nád mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit pedig kék színnel jelöltük. A mintavételi időpont alapján a májusi minták zöldek, a szeptemberi minták barnák. **A)** Hierarchikus osztályozás eredményeként 1000 ismétléssel létrehozott hasonlósági dendrogram (Jaccard index, UPGMA módszer), az elágazásokban a *bootstrap* értékeket is feltüntettük. A főcsoportokat a megfelelő színű téglalapok, a kisebb csoportokat háromszögek jelzik. **B)** Nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) eredményeként kapott háromdimenziós ábra (Jaccard index, stressz érték: 0,101). A 2D felületen a legnagyobb hasonlóságot mutató mintapárokat vonal köti össze, a kisebb csoportokat a megfelelő színű ellipszis jelzi.

A szennyvízzel érintkező gyékény minták (1-8) egy nagy csoportot alkottak, hasonlóan az I-es és III-as DGGE ujjlenyomatokhoz, viszont a nád minták feldarabolódtak. Az NMDS ábrán jól követhető, hogy a nád-rizoszféra minták (11 és 13) inkább a gyékény mintákkal együtt alkotnak egy főcsoportosulást (36. ábra). A telepítés helyéről származó, szennyvízzel nem érintkező gyékény minták (15 és 16) a másik három primerpárral az UPGMA dendrogramokon mindig egy diszkrét csoportot alkottak; a többi gyékénymintán belül (III-as), vagy egy teljesen különálló klaszterként (I-es). Ezt a mintapárosodást a IV-es primerpár nem támasztotta alá, sőt a 16-os mintát különválasztotta a többi gyékény mintától (az NMDS ábra második dimenzió szerinti kiugró érték alapján). Az UPGMA dendrogram ezt a kiugró mintát (*outlier*) inkább a nád mintákhoz tette hasonlóvá, azonban az NMDS elemzéssel jól látható, hogy ez a gyékény-rizoplán minta a D1-D3 felületen nagyon közel található a mesterséges lápról származó májusi gyékény-rizoplán mintákhoz (3 és 4). Geometriailag D2 értéke szerint ez a minta (16-gyékény-rizoplán) közel hasonló távolságra található a 11-13 nád rizoszféra mintapárhoz és a gyékény mintákhoz is. Azonban a 16-os minta szoros együttállása a 3-4 mintapárral a D1 és D3 dimenziók szerint egyértelmű biológiai információt hordoz, mivel mindhárom minta gyékény rizoplánból származik. Ebben az esetben a dendrogramnál informatívabbnak bizonyult az NMDS 3D ábrázolásmód, amely a három dimenzió segítségével jobban árnyalta a minták hasonlósági viszonyait. A 16-os minta különállóságát a 3D ábrán fekete színnel jelöltük. A gyékény klaszteren belül megjelent csoportosulási tulajdonságként a szezonális. Mindkét ábrázolási mód szerint élesen elkülönülnek a májusi (1–4) és szeptemberi (5–8) minták, illetve a májusi minták ezen belül a rizoszféra frakciók szerint tovább váltak szét mintapárookra (1-2 gyékény rizoszféra, 3-4 gyékény rizoplán).

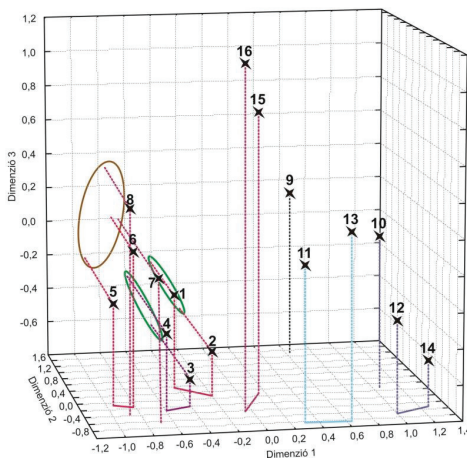
Mind a négy DGGE mintázat esetében elsődleges csoportosulás a növények típusa szerint történt. Ahol a főbb csoportok teljesen lefedhetőek voltak a gyékény vagy nád tulajdonsággal [I-es (V1+V2) és III-as (V3) primerpárok], ott a minták másodlagosan a rizoszféra frakciók szerint, és csak ezen belül a mintavétel időpontja alapján alkottak kisebb csoportokat. Azonban a II-es (V1-V3) és a IV-es (V6-V8) primerpárokkal, amelyeknél a főcsoportok alakulását nem lehetett egyértelműen egy tulajdonság szerint magyarázni, jobban előtérbe került a szezonális hatása (május-szeptember). A IV-es primerrel szintén majdnem teljesen a növény típusa jellemezte a fő elkülönüléseket, viszont másodlagos szempont volt a mintavétel időpontja és csak ezen belül jelentkezett a rizoszféra frakciók különbözősége. A II-es primerrel a főklaszterek kialakításában elsődleges hasonlósági szempontként a növény típusa és a mintavétel időpontja együttesen jelentkezett, további csoportosítási szempont a rizoszféra frakciók típusa volt.

Négy primerpár egyesítve (I. + II. + III. + IV.)

A)



B)



37. ábra. A négy DGGE mintázat egyesítésével kapott mesterséges bináris adatmátrix statisztikai elemzése.

A 16 minta jelölése megegyezik a 2. táblázatban alkalmazott jelölésekkel. **A)** Hierarchikus osztályozás eredményeként 1000 ismétléssel létrehozott hasonlósági dendrogram (Jaccard index, UPGMA módszer), az elágazásokban a *bootstrap* értékeket is feltüntettük. A főcsoportokat a megfelelő színű téglalapok, a kisebb csoportokat háromszögek jelzik. **B)** Nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) eredményeként kapott háromdimenziós ábra (Jaccard index, stressz érték: 0,085). A 2D felületen a legnagyobb hasonlóságot mutató mintapárokat vonal köti össze, kisebb csoportokat a megfelelő színű ellipszis jelzi. A „kilógó” 9-es minta fekete.

V.5.c A négy primerpár DGGE mintázata egyesített elemzésének eredménye

A különböző primerpárokkal kapott ujjlenyomatok felbontásukban (csíkszám) és a minták hasonlósági viszonyaiban is különböztek egymástól. A négy DGGE mintázatot külön elemezve a minták közötti hasonlóságokat részben megerősítették a különböző primerek által kapott eredmények, részben pedig ellentmondtak egymásnak. A valós bakteriális közösség diverzitásáról nyerhető legpontosabb képet feltehetően ezen adatok összessége hordozza. A primerpáronként elemzett ujjlenyomatok adatait ezért egy közös bináris adatmátrixba egyesítettük, és az így kapott mátrixot statisztikailag a korábbiakkal megegyező módon értékeltük, melynek eredményét a 37. ábra mutatja. A DGGE ujjlenyomatok egyenkénti elemzése során két kiugró adat mutatkozott: a III-as primerpárral a 9-es, illetve a IV-es primerpárral a 16-os minta. Az egyesített DGGE adatmátrix mintánkénti átlag csíkszáma $132,8 \pm 24,5$ volt, a legkevesebb csíkot a 9-es minta tartalmazta (97 db csík, 32. ábra); különállása egyértelműen magyarázható volt a mintából nyert kis PCR termék mennyiséggel. Az egyesített elemzéssel kapott dendrogram illetve NMDS ábrán szintén teljesen különálló mintaként jelentkezett a 9-es minta (májusi nád-rizoszféra, a „fekete-bárány” 37. ábra). A négy primerpár közös analízisével a 16-os minta sem a csíkszám alapján (114 db csík), sem az ábrázolásokban nem mutatkozott „kilógó” mintának. A különállása egy primerpár mintázata alapján jelentkezett (IV-es), és ez azzal magyarázható, hogy abban az elemzésben ez a minta közel azonos hasonlóságot mutatott két kisebb csoporthoz is.

Az egyesített elemzéssel kapott UPGMA dendrogram alapján három élesen elkülönülő főcsoport különböztethető meg, amelyek egyértelműen a növény jellege szerint szeparálódtak. Ezek a klaszterek az NMDS ábrán is külön csoportot alkotnak, amelyet legjobban a D1-D3 felület szemléltet. Az I-es és III-as primerpárok eredményével összhangban a nád minták teljesen elkülönültek a gyékény mintáktól, illetve a 15–16-os mintapár, amely a telepítés helyéről származó gyékény mintákat jelöli, a többi gyékénymintától különálló csoportot alkotott. A nádmintákon belül két kisebb csoport mutatkozott: a nád-rizoszféra és nád-rizoplán frakciók. A csoporton belüli hasonlóság ezekben a nád-frakciókban volt a legnagyobb mértékű (48%–54%). A nád minták csoportokba rendeződését tehát elsősorban a rizoszféra frakció típusa határozta meg, és a mintavétel időpontjából adódó különbség a DGGE mintázatok alapján nem mutatkozott. Ellenben a mesterséges lápról származó gyékény minták (1–8) klaszterén belül a minták szezonális szerint rendeződtek: a szeptemberi minták egy négytagú csoportba (5–8), a májusiak pedig két kéttagú csoportba (1-2, 3-4) (37. ábra).

A gyékényminták szezonális szerinti csoportosulása az NMDS ábra D1-D3 felületén a legszembevetőbb. A májusi és szeptemberi csoporton belül a legnagyobb hasonlóságot mutató mintapárosodások egyértelműen megfeleltethetőek voltak az adott rizoszféra

frakcióknak. Az egyesített adatok alapján tehát a gyékény minták elsődlegesen a növény típusa szerint, és az alapján, hogy szennyvízzel érintkezett-e a minta, másodlagosan a mintavétel időpontja, és ezen belül a rizoszféra vagy rizoplán frakciók szerint csoportosultak. A nád és gyékény esetében a legnagyobb hasonlóságot mutató mintapárokat minden esetben az adott növényi rizoszféra frakciónak lehetett megfeleltetni (Typ vagy Phr RS vagy RP).

Feltevésünknek megfelelően a mesterségesen létrehozott, bináris adatmátrix elemzése valóban egyedi módon ötvözte a külön-külön elemzett mintázatok eredményét, és jobban árnyalta a minták hasonlósági viszonyait. Az adatok egyesítésével lehetett egyértelműen azonosítani a valóban hibásan kiértékelhető, kilógó mintákat (9-es). A minták csoportosulását elsődlegesen meghatározó tényezőket illetően tett megállapításaink csak az általunk vizsgált, erősen diverz gyékény illetve nád rizoszféra frakciókra érvényesek. Megállapítható, hogy a minták hasonlóságában a legmeghatározóbb tényező a növény típusa, és másodsorban a rizoszféra frakciója volt. A növény típusától függően, gyékény esetében a különböző rizoszféra frakciók a mintavétel időpontjától függően nagyobb csoportokba rendeződtek, míg ilyen szezonális megosztottságot a nád minták esetében nem tapasztaltunk. Az egyenként elemzett DGGE mintázatok alapján ezeket a következtetéseket nem tudtuk volna egyértelműen megállapítani. A Jaccard-indexen alapuló hierarchikus osztályozás és az NMDS ordináció alapján a hasonlósági csoportosulásokból messzemenő ökológiai következtetéseket nem szabad, és nem is lehet levonni. Két mintavételi időpont alapján természetesen nem lehet szezonális dinamikára vonatkozóan megalapozott kijelentéseket tenni, de nem is ez volt a különböző primerekkel végzett DGGE elemzések célja. Az azonban mindenképpen figyelemreméltó, hogy a **növény típusának (Typ-Phr) hatása minden kétséget kizáróan tükröződött a minták hasonlósági viszonyaiban**, ami megmutatkozott az egyesített DGGE elemzés alapján kapott csoportosulásokhoz tartozó magas *bootstrap* értékekben²². Találkozhatunk olyan tanulmányokkal is, amelyben arról számolnak be, hogy különböző ujjlenyomat módszerekkel mesterséges lápok (CW *constructed wetland*) vizsgálatánál nem tapasztaltak olyan mintázati különbséget, amelyet a növény meglétével vagy hiányával magyarázhattak volna (Ahn *et al.*, 2007; DeJournett *et al.*, 2007; Baptista *et al.*, 2008). Ahn és mtsai (2007) *Bacteria* 16S rRNS gén és LH-PCR technikával vizsgálta rizoszféra minták hasonlóságát különböző foszfor-terhelés mellett. A minták a kis és nagy foszforterhelés szerint csoportosultak, a vegetáció meglétének vagy hiányának lényeges hatását viszont nem tapasztalták. Azonban vizsgálataikat laboratóriumi mikrokozmosz kísérletekben végezték, és lehetséges, hogy a foszfor terhelés jelentős hatása elfedte a közösség növény általi alap

²² A Raup és Crick hasonlósági indexek (Raup és Crick, 1979) alapján kapott $S_{R\&C} > 0,95$ értékek alátámasztották a nád és gyékény minták közötti szignifikáns különbséget. A Raup és Crick valószínűségi hasonlósági index azt vizsgálja, hogy a minták között tapasztalt hasonlóság nagyobb ($S_{R\&C} > 0,05$), vagy kisebb ($S_{R\&C} > 0,95$) annál a hasonlóságnál, amely csupán véletlenszerűen is adódhat (Rowan *et al.*, 2003).

meghatározottságát. Baptista és mtsai (2008) szintén laboratóriumi mesterséges lóp baktérium közösséget vizsgálták DGGE módszerrel (III. primerpár). A hierarchikus osztályozás szerint a növény nélküli medencékhez képest a náddal beültetett medencék egymással jóval nagyobb hasonlóságot mutattak, azonban az általuk használt Raup és Crick index (Raup és Crick, 1979) alapján ez a különbség nem minősült szignifikánsnak (Baptista *et al.*, 2008). A növény típusának alapvető meghatározottságát saját eredményeinkkel összhangban azonban több kutatócsoport is leírta (Gagnon *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Calheiros *et al.*, 2009; Ruiz-Rueda *et al.*, 2009). Ruiz-Rueda és mtsai (2009) hasonlóan DGGE módszerrel jelentős különbséget kaptak a sima mesterséges lápról származó talaj és rizoszféra minták denitrifikáló közössége között, amelyben a vegetáció típusának hatása is megmutatkozott. Calheiros és mtsai (2009) ipari szennyvíz tisztítását különböző terhelés mellett, két egymással párhuzamosan kapcsolt, egyenként kétlépcsős mesterséges láppal tisztították, amelyben a mi rendszerünkhöz hasonlóan *T. latifolia* és *P. australis* növényeket ültettek. A növényi parcellák szubsztrát és gyökér mintáinak baktérium közösségét PCR-DGGE módszerrel (V3) vizsgálták, eredményeiket hierarchikus osztályozás és 2D MDS módszerrel ábrázolták. Mindkét módszerrel a minták csoportosulása egyértelműen a növény-típus és parcella szerint történt, a minták szezonalitása nem jelentkezett a hasonlósági viszonyokban.

Természetesen az is erősen mintafüggő, hogy az egyesített eredményhez melyik primerpár mintázataának analízise hasonlít legjobban (jelen esetben a III-as primerpár), és ezt erősen befolyásolja a DGGE felbontása. Azonban ez alapján egyértelműen nem jelenthető ki egy adott primerpárról, hogy „jó” vagy „rossz”. A különböző futások alapján a „valószínűbb” mintázatot eredményező primer – megerősítve 16S rRNS adatbázisok által végzett illeszkedés vizsgálatok eredményével (Függelék 23. táblázat) – már meghatározhatja a további vizsgálatok primer választását. Mikroba közösségek összetételének és szerkezetének feltérképezésére polifázikus megközelítéseket javasolják, amellyel ugyanazt a mintát több különböző módszerrel vizsgálják (pl. tenyésztéstől függő és tenyésztést nem igénylő módszerek). Az általunk vizsgált rizoszféra minták DGGE elemzése alapján határozottan ajánlhatjuk, hogy egy ujjlenyomat módszeren belül is érdemes többféle primerpár összesített eredményét elemezni a teljesebb mikrobiális diverzitás megismerésének érdekében.

A különböző primerpárok DGGE mintázataának eltérése többek között visszavezethető az általuk amplifikált szakaszok változatosságának különbségére, amely meghatározza a DGGE által elválasztott OTU-k filogenetikai mélységét. Hasonló példát említhetünk a T-RFLP ujjlenyomat módszer esetében is, ahol egy adott minta és primerpár kombinációja esetében is a különböző restriktációs enzimekkel történt emésztések a minták eltérő csoportosulásához vezethetnek. Ennek oka, hogy az enzimek első hasítóhelye eltérő taxonómiai információt hordozó DNS szakaszt érinthet, és így eltérő taxon-szintű felbontást

eredményezhet. Ezt az enzimfüggő felbontásbeli különbséget tapasztaltuk gombakomposzt minták vizsgálatánál is (Székely *et al.*, 2009). A valósághoz legközelebb álló megállapításainkat a különböző enzimekkel illetve primerekkel nyert eredmények ötvözéséből vonhatjuk le.

Kísérletünkhöz hasonlóan a 16S rRNS gén különböző doménjeit vizsgálták Mills és mtsai (2006) talajmintákon, azonban ehhez az LH-PCR (*amplicon length heterogeneity PCR*) molekuláris „ujjlenyomat” módszert használták. A hipervariábilis régiók közül a V1, V3 és V1+V2 illetve ezek kombinációját Bray-Curtis indexen alapuló NMDS és Shannon diverzitás index segítségével elemezték. A két vizsgálati módszer összevetéséből a NMDS-t találták informatívabb módszernek a LH-PCR közösségi profil vizsgálatára, mert az jobban tükrözte a minták közötti hasonlóságot. A különböző régiók alapján eltérő csoportosulásokat kaptak; az összesített elemzés szeparálta legjobban az őshonos és a megművelt mezőgazdasági területek talajmintáit, azonban a különböző mélységből származó minták elkülönülését csak bizonyos variábilis régiók és kombinációjuk mutatta. Különböző eredetű komposzt minták 16S rRNS gén alapú összevetését végezték Klammer és mtsai (2008) DGGE módszerrel és három különböző variábilis régiót amplifikáló primerpárral. Mivel hasonlóan a mi eredményeinkhez ők is mindhárom esetben eltérő felbontású mintázatot és különböző mintacsoportosulást kaptak, több primerpárral történő vizsgálatot és ezek összevetését ajánlották, azonban az egyes futások közös értékelését nem végezték el. Egyes komposzt minták konzekvensen azonos csoportosulást mutattak, függetlenül az alkalmazott primertől, ami más kémiai elemzés eredményeivel is összhangban állt, azonban nagyobb klaszterek/csoportok azonosítása nem volt lehetséges. Különböző primerekkel kapott eredményeiket hozzánk hasonló módon vonták össze Boon és mtsai (2002), akik különböző típusú aktív szennyvíziszapok bakteriális közösségét vizsgálták 16S rRNS gén alapú „nested”-PCR-DGGE módszerrel, párhuzamosan egy „univerzális”, és 6 csoport specifikus primerrel. A hét DGGE futás összevont adatai alapján készült hierarchikus osztályozás a négy különböző szennyvíz csoportból két típust tisztán elkülönített, míg a külön-külön vizsgált eredmények ezt csak részben támasztották alá. A mi eredményeinkkel összhangban az általuk végzett NMDS elemzés is megerősítette az egyesített hierarchikus osztályozás eredményét.

Nagyban segítette az eredményeink értelmezését, hogy ötvöztük az NMDS 3D ábrázolást az UPGMA dendrogramokban mutatkozó hasonlóságokkal. A fő klaszterek markáns elkülönülését mindkét statisztikai módszerrel kapott eredmény jól érzékeltette, azonban az NMDS ábrák három dimenziója élesebben mutatta a főbb csoportok szétválását. Az NMDS ordináció a kisebb csoportokat is jól elválasztotta egymástól (pl. mintavételi időpont szerint), viszont az egyes mintapárok hasonlósága éppen a három dimenzió összetettsége miatt nem volt mindig egyértelmű. Az UPGMA dendrogram alapján az egyes

nagy hasonlóságot mutató mintapárok megjelölése az NMDS ábrán éppen ezeket a hasonlóságoknak hivatott hangsúlyt adni. Az általunk elemzett DGGE mintázatok esetében a két statisztikai elemzés eredményének kombinációja egyértelműen többlet információt hordozott, és a különböző módszerek ötvöztetésével sikerült a különböző rizoszféra frakciók hasonlóságát legjobban tükrözni.

V.5.d Összegzés

- Különböző 16S rRNS génre tervezett primerpárokkal a DGGE mintázatok **eltérő felbontást** (csíkszám) eredményeztek, és **eltérő hasonlósági viszonyokat** tükröztek. Egyetlen DGGE futás elemzésével hamis következtetésekre juthatunk, amennyiben a fajdiverzitást csíkszámok alapján becsüljük.
- „Univerzális” 16S rRNS gén alapú közösségvizsgálatoknál a különböző diverzitás-indexek mellett **értelmes osztályozási, vagy ordinációs módszert is** alkalmazni a közösségi elemzésnél (Calheiros *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2009).
- **Több primerpárral párhuzamosan** végzett DGGE futtatás eredményét **összevonva** is ajánlott elemezni. Ezáltal a hasonlósági viszonyok meghatározása megalapozottabb, és a hibás minták azonosítása is csak így lehetséges (37. ábra).
- A DGGE módszer lényege, hogy gyors és viszonylag költséghatékony módja több minta egyidejű mikrobiális közösség szerkezet vizsgálatának. Ezért ha több mintasorozatot kell időben nyomon követni, érdemes az első mintákon több primerrel kísérletezni, majd **az egyesített elemzéssel kiválasztani egy primerpárt**, ami az adott mintára a leghatékonyabb, és a további kísérleteket ezzel a primerpárral végezni (jelen esetben a III-as, GC-341F-534R primerpár).
- A hierarchikus osztályozás és az NMDS ordináció **statisztikai eredményének kombinációja** által pontosabb képet kaptunk a különböző növényi rizoszféra minták hasonlóságára vonatkozóan.

V.6 A DGGE gél különböző részeiből visszanyert DNS vizsgálata

A mikroba közösségekről kapott DGGE mintázatok egy gélen belül nagyon jól reprodukálhatóak, amelyet saját tapasztalataink is alátámasztottak, amikor ugyanabból a mintából több párhuzamos DNS izolálás és párhuzamos PCR termékeket egy gélben, egymás mellett futtattunk. Természetesen a DGGE mintázat felbontása erősen minta- és primerfüggő, amint azt a különböző növényi rizoszféra frakciók illetve a gombakomposzt közösségek esetében is tapasztaltuk. A módszer köztudottan a közösség domináns tagjainak detektálására alkalmas. Irodalmi adatok szerint a módszer alkalmas a közösségben 1,0%-1,6%-ban jelenlévő filotípusok kimutatására (Muyzer *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 1996); pontosabban fogalmazva, egy filotípusnak a PCR termék legalább 1,0%-át kell kitennie ahhoz, hogy a mintázatban detektálhatóan megjelenjen.²³

Egy pillanatra most feledkezzünk meg a DNS izolálás és a multitemplát PCR lépés során fellépő aránymódosulásokról, és csak arra keressük a választ, hogy a DGGE ujjenyomat módszerrel hogyan lehetne még pontosabban feltérképezni egy adott környezeti minta teljes, valódi bakteriális diverzitását. Ehhez természetesen szükség van a kis kópiaszámban jelenlévő, ún. ritka fajok kimutatására is. Kísérletet tettünk ezeknek a fajoknak a kimutatására, és feltételeztük, hogy nyomukra a DGGE mintázatok diszkrétén kirajzolódó csíkjai között bukkanhatunk. Azért merésztünk az ún. háttérfestődésben vizsgálni ritka, a közösségben nem domináns fajok után, mivel köztudott, hogy minél diverzebb egy mikroba közösség, az univerzális 16S rRNS génre tervezett primerekkel nyert DGGE mintázatokban annál erősebb a denaturáló PAA gél háttérfestődése (*smear*), ami részben a nagyon nagyszámú (gyenge és nem-elkülönülő) csíknak tudható be.²⁴ Egy bizonyos mértékű diverzitás felett, (főként pl. talajoknál figyelhető meg) a módszer eléri korlátait, és nem képes több filotípus elválasztására; ebből adódóan egyre erősebb háttérfestődést tapasztalhatunk. Pusztán a diszkrét csíkok számát figyelembe véve a diverzitás becslésében is hibás következtetéseket vonhatunk le nagyon nagy diverzitású minták esetében. Ekkor érdemesebb szűkebb specifitítású (csoport-specifikus) primereket használni.

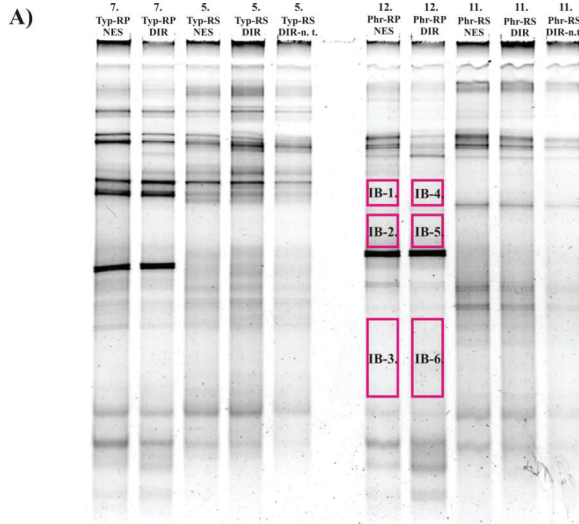
Feltételeztük, hogy a közösségben (valójában a multitemplát PCR-ben) kis mennyiségben található fajok a DGGE módszer detektálási korlátai miatt a diszkrét csíkok mentén, illetve között helyezkednek el a gélben. Mivel bevett szokás, hogy a denaturáló gél csíkaiból visszanyerik a DNS-t, amit DNS bázissorrend elemzéssel vizsgálnak, jogosan ötlött fel bennünk, hogy diszkrét csíkokat nem tartalmazó régiókból vágjunk ki nagyobb

²³ Nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a PCR termékből DGGE elválasztással detektált „empirikus” diverzitás nagyban függ a megválasztott futási körülmények és az alkalmazott DNS festési módszer érzékenységtől.

²⁴ Természetesen minden esetben optimális, felesleges festékanyagtól mentes DGGE gél mintázatokat feltételeztünk.

gélدارabokat. A gél-tömbökből kinyert DNS újra-felszaporításával arra számítottunk, hogy a ritkább filotípusok egy újbóli DGGE szeparáció során diszkrét csíkként jelenhetnek meg a kivágott területen, az eredeti közösségi mintázatoktól eltérő, új pozíciókban.

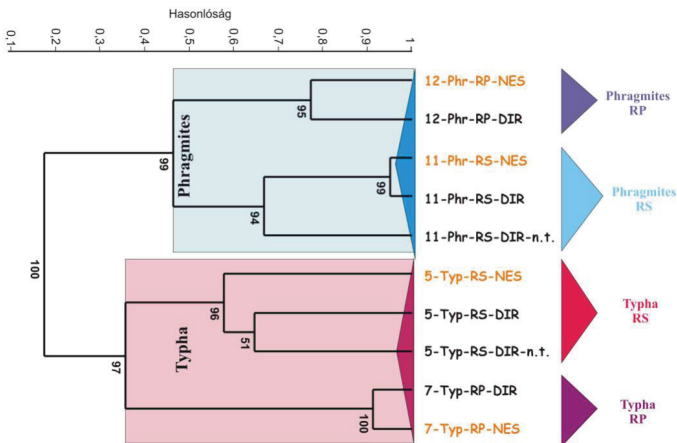
A hipotézisünk igazolásához az erősen diverz gyékény és nád rizoszféra és rizoplán minták DGGE mintázatait használtuk. Minden minta esetében egylépéses (*direkt* - DIR) és kétlépéses (*nested* - NES) PCR stratégiák eredményét is összehasonlítottuk, egyaránt az eredeti közösségi DGGE mintázatok, illetve az újra-amplifikált gélدارabokból nyert DGGE mintázatok különbsége alapján. A DIR minták esetében a PCR termékeket megtisztítva és tisztítás nélkül is vizsgáltuk. A gélدارabokat végül a kevesebb DGGE csíkot adó nád rizoplán (12-Phr-RP) mintából és különböző denaturáló koncentráció tartományú részekből metszettük ki (38/A ábra). Nagyon figyelmesen jelöltük ki a kivágandó PAA gélدارabokat, amelyek minden esetben szemmel láthatóan diszkrét csíkokat nem tartalmazó – esetenként háttérfestődést is alig adó – régiókból származtak. A DGGE gél felső régiójából metszett darabok (kisebb denaturálószer koncentráció; IB-1, IB-2 illetve IB-4, IB-5) erősebb festődésűek voltak, mint az alsó gél részből vágott téglatestek (nagyobb denaturálószer koncentráció; IB-3 és IB-6) (38/A ábra).



38. ábra. A „nested” (NES) és az egylépéses (DIR) PCR stratégia összehasonlítása DGGE gélkép és hierarchikus osztályozás alapján. A négy környezeti minta rövidítése és számozása a 2. táblázatnak megfelelő.

A) A különböző környezeti minták PCR-DGGE analizisével (GC-63F-338R primerpárral) kapott DGGE ujjlenyomat mintázata. Téglalapokkal jelöltük a diszkrét csíkokat nem tartalmazó, háttérfestődésből (*smear*) kivágott régiókat (IB=*interband*). Ahol külön nem jelöltük (n.t.=nem tisztított PCR termék), a PCR termékeket a DGGE elektroforézist megelőzően tisztítottuk.

B)



38/B ábra. Hierarchikus osztályozás eredményeként nyert hasonlósági dendrogram (Jaccard index, UPGMA módszer). A gyékény mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit piros színnel, a nád mintákat és rizoszféra-rizoplán frakcióit pedig kék színnel jelöltük. A főcsoportokat téglalapok, a kisebb csoportokat háromszögek jelzik.

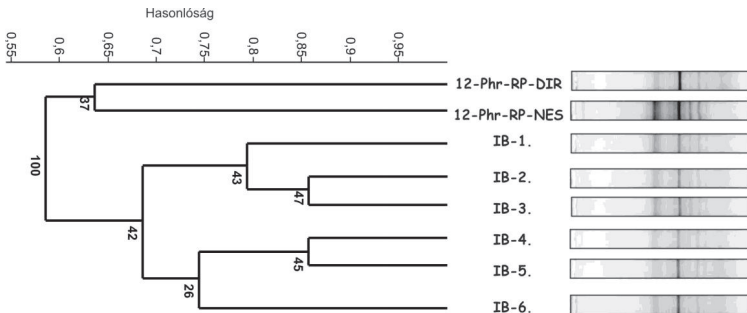
A DGGE mintázatokból kalkulált bináris mátrixokat használtuk hierarchikus osztályozásra, a hasonlósági viszonyok feltérképezésére. A korábbi eredményeink tükrében nem meglepő, hogy a minták csoportosulása a növény típusa, és ezen belül a rizoszféra frakció szerint történt (38/B ábra). Ami szabad szemmel is elég jól kivehető, hogy a DIR és NES stratégiák a DGGE csíkok száma és eloszlása alapján szinte azonos ujjlenyomat mintázatot eredményeztek, azonban jelentős különbségek adódtak az egyes csíkok intenzitásában (denzitásában) (12-Phr-RP-minta; 38/A ábra). A kétféle PCR stratégia nem eredményezett szignifikáns mintázatzbeli eltéréseket.²⁵ A tömönyebb – a PCR termék tisztítási lépése során koncentrált – mintákban sokkal élesebb csíkokat tudtunk azonosítani, bár ezek is csaknem teljesen azonosak voltak az ugyanabból a mintából DIR módszerrel előállított, és utólag tisztított PCR termékek mintázatával. A könnyebb kiértékelhetőség miatt érdemesebb azonban a PCR termékeket DGGE elektroforézis előtt tisztítani.

A kivágott géldarabokból visszanyert, és újból PCR-rel szaporított DNS-t ugyanolyan körülmények között ismételt elektroforézisnek vetettük alá. Ugyanabban a DGGE gélben futott a hat kivágott részből (IB1.–6.) származó DNS minta, együtt azzal a közösségi mintával, amelyből a géldarabokat eredetileg kimetsztük (12-Phr-RP–NES/DIR). Ezzel kizártuk a denaturáló PAA gélek közötti különbségből eredő eltéréseket, és így az eredeti (12-

²⁵ Ez a megállapítás a Raup és Crick hasonlósági index alapján nyert bizonyítást (Raup és Crick, 1979).

Phr-RP) és a származtatott (IB minták) mintázatok azonossága illetve különbsége egyértelműen bizonyítható.

Egészen meglepő eredményt kaptunk: ahelyett, hogy új csíkokat detektáltunk volna, minden kivágott géldarab esetében, függetlenül a kivágás pontos helyzetétől (kis/nagy denaturálószer koncentráció) vagy a PCR típusától (DIR/NES), döbbenetes módon minden esetben visszakaptuk csaknem a teljes eredeti minta DGGE mintázatát (39. ábra). Az újr-felszaporított mintáknál pár esetben tapasztaltuk, hogy 1-2 csíkot nem detektáltunk az eredeti mintához képest. Az eredeti DGGE gél (38/A ábra) sávjainál jól megfigyelhető a kivágott gélrészek kis DNS tartalma. Az ismételt PCR felszaporítási lépéssel is csak jóval kisebb hozamú PCR termékeket tudtunk előállítani; ezzel összefüggésben gyengébb erősségű mintázatokot detektálhattunk a megismételt elektroforézis során, ami magyarázhatja egyes csíkok eltűnését. Számítottunk arra, hogy a kimetszett régiók közelében elhelyezkedő csíkok esetleg eltűnhetnek az újbóli amplifikálás után; azt, azonban, hogy a mintáink teljes DGGE mintázatát visszakapjuk, függetlenül a kivágás pozíciójától, egyáltalán nem vártuk.



39. ábra. A 38/A ábrán jelölt gél háttérfestődésből kinyert, és az **I.** primerpárral újra szaporított DNS DGGE mintázata alapján nyert hasonlósági dendrogram (Jaccard index, UPGMA módszer). A háttérfestődésből kivágott régiók (IB=interband) mellett a gélben az eredeti mintából egy (DIR) illetve két lépésben (NES) nyert PCR termékek is együtt futottak.

A DGGE molekuláris „ujjlenyomat” technika számos elválasztás technikai problematikája már ismert és sokak által tapasztalt. Mindenki, aki valaha alkalmazta a DGGE módszert, találkozott a híres jelenséggel, miszerint nem ritka, hogy „egy faj nem egy csíkban” jelenik meg a gélben, illetve a fordítottja is igaz, miszerint „egy csíkban több faj DNS-ét is rejtheti”. Az egyik leggyakoribb probléma az „**együtt-vándorlás**” jelensége (különböző szekvenciák azonos helyre vándorolhatnak egy gélben), mely gyakran okozza, hogy diszkrét csíkokból kevert szekvenciákat tudnak csak kinyerni (Ferris *et al.*, 1996; Sekiguchi *et al.*, 2001). Hasonló probléma SSCP alkalmazásoknál is jelentkezett (Schmalenberger és Tebbe,

2003). A DGGE módszerhez igen hasonló TGGE módszer alkalmazása során Zhang és mtsai (2005) is tapasztalták, hogy egy csíkból erősen heterogén szekvencia információ nyerhető, amelyért bizonyítottan az egyszálú DNS molekulákat (ssDNS) tették felelőssé. A ssDNS molekulák számát PAGE tisztítással és enzimatis úton (*Mung Bean nuclease* kezelés) is sikeresen csökkentették (Zhang *et al.*, 2005). Az enzimatis kezelés kellő optimalizáció nélkül azonban gyakran a duplaszálú DNS aspecifikus degradálódásához vezet (Nikolausz M., szóbeli közlés). Manapság bevett gyakorlat, hogy a garantáltan tiszta szekvencia kinyerése érdekében a DGGE mintázatok diszkrét csíkjait megfelelő vektorokba klónozzák, majd ezután határozzák meg nukleotid bázissorrendjüket (Stafford *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Ez a problémára ugyan hathatós megoldás, azonban óriási idő és pénzügyi ráfordítást igényel; elveszítve ezzel a DGGE igazi előnyét, a gyorsaságát. Széles, nem élesen elkülönülő („fuzzy”) csíkokat okozhatnak az egy DNS szakaszon belül különböző, de közel azonos olvadási hőmérsékletű szerkezeti egységek, ún. „többszörös olvadási domének” (*multiple melting domain*, MMD) létezése (Kisand és Wikner, 2003). Az MMD-k a DGGE szeparáció hatékonyságát rontják, és hamisan kelthetik nagyfokú diverzitás látszatát.

Az általunk tapasztalt jelenség azt jelzi, hogy nem csak különböző DNS szekvenciák vándorolnak együtt a denaturáló gélben, hanem a domináns PCR amplikonok eloszlanak a denaturáló gél teljes terjedelmében. A gél háttérfestődéséből szinte hiánytalanul visszkapott sávmintázatok azt sugallják, hogy a gélben „*minden amplikon mindenhol*” megtalálható és az újbóli amplifikáció során a PCR szelektál. Az azonos hosszúságú PCR amplikonok elválasztását, és egy komplex közösség esetében az ebből detektálható mintázatot, elméletben a DNS molekulák szekvenciája által determinált olvadáspont határozza meg. Azonban tapasztalatunk fényében feltételezhetően ennél sokkal bonyolultabb kölcsönhatások alakítják ki a több fajtából álló, kevert PCR termékek DGGE mintázatát.

A PCR során keletkező: heteroduplex molekulák, a nem teljes szálak (Janse *et al.*, 2004), az egyszálú DNS-ek, vagy éppen az *rrn* operonok intraspecifikus különbségéből (Crosby és Criddle, 2003) eredően, ugyanaz a DNS templát több csíkban jelenhet meg a DGGE mintázatban, ezáltal a valós diverzitást túlbecsülhetjük. Egyes *Bifidobacterium* törzsek DGGE vizsgálatánál bizonyítottan a heteroduplex molekulák hatására detektáltak egy törzből több csíkot is (Satokari *et al.*, 2001). Hasonló anomáliát Speksnijder és mtsai (2001) is tapasztaltak, amikor közel-rokon 16S rRNS környezeti klónok mesterséges templát keverékét (7 klón) használták PCR-DGGE elemzésére. A közösségi mintázatban két új csíkot azonosítottak, amely a klónok monotemplát PCR-DGGE mintázataiban nem mutatkozott meg. Ezeket a csíkokat kivágták és PCR-rel újra szaporították. Eredményül mindkét csíkból az összes klón csíkját visszakapták, amit az eredeti kevert templáttal is előállítottak; különbség csak a csíkok intenzitásából adódott. A jelenséget heteroduplex képződéssel

magyarázták, de az általunk komplex környezeti mintán végzett kísérletek eredményének tükrében feltételezhetően a jelenség háttérében nem egyszerűen csak a heteroduplex molekulákat kell keresnünk. A PCR során a nem teljes szálak keletkezése jelentősen befolyásolja a közösségek DGGE mintázatát és egészen összetett problémát okoz az újbóli PCR szaporítás során. A kisebb molekulatömeg, és ezzel együtt a megnövekedett mobilitás miatt a félkész PCR termék a gélben más helyre vándorol, mint a teljesen meghosszabbított duplaszálú (dsDNS) megfelelője, azonban az újra-amplifikálással visszakaphatjuk belőle az eredeti duplaszálú terméket. Ha a GC-kapcsos primer felől nem teljes a DNS szál, akkor nem megy végbe teljes denaturáció, viszont ha a GC-kapocs nélküli primer felől nem megy végbe teljes mértékben a lánchosszabbítás, akkor a denaturáció során különböző hosszúságú, és eltérő vándorlási sebességű ssDNS molekulák jönnek létre. A teljes hosszúságú egyszálú DNS-ből újra amplifikálással viszont visszanyerhetjük az eredeti dsDNS-t, ami viszont már máshová vándorol a DGGE gélben, mint a félkész termék.

Nem kizárt, hogy számolnunk kell a gélben az amplikonok térbeli, statisztikai megoszlásával is. Ezt a lehetőséget eddig még nem vizsgálták behatóan, de szerepet játszhat a tapasztalt DGGE re-amplifikációs anomália jelenségében, és magyarázhatja a gél háttérfestődését is. Viszonylag jelentős lehet annak a valószínűsége, hogy a domináns, nagy számban jelenlévő PCR amplikonok nemcsak az általuk meghatározott csíkban, hanem a gélben bárhol előfordulhatnak; és ez mindenképpen megdöbbentő eredmény. Az újbóli PCR szaporítás anomáliája befolyásolhatja a DGGE csíkokból kinyert szekvencia információt, ezért a további vizsgálatok szükségesek a szekvencia adatok pontos háttérének tisztázásához. A probléma miatt a DGGE csíkok azonosítására célravezetőbb módszert jelent a környezeti mintából nyert PCR termék klónozása, majd a domináns klónok markerként futtatása az eredeti mintával párhuzamosan. Ez alapvetően azonos a gombakomposzt T-RFLP elemzések során alkalmazott módszerhez (*sequence-aided T-RFLP*), amely szintén klónok segítségével azonosítja a közösségi mintázatok egyes filotípusait (Székely *et al.*, 2009). Ne feledjük, a DGGE technikát orvos diagnosztikai célból, pontmutációk detektálására fejlesztették ki (Myers *et al.*, 1985), ahol ilyen problémákkal nem szembesültek. Azonban a mikrobiális ökológiai alkalmazásokban igen összetett PCR termékek elválasztását kell véghezvinni, még egy kis diverzitású minta esetében is, ezért fontos tisztázni a DGGE módszerből nyerhető információ valós tartalmát.

VI. EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE

A mikrobiális ökológia fejlődésének vitathatatlanul egyik legnagyobb mérföldkővét a PCR és az erre épülő ujjlenyomat módszerek elterjedése jelentette. Ezen technikák gyors és hatékony eszközt nyújtottak a mikroba közösségek megismerésére, a változások nyomon követésére. Az elemzések immár minimális kiindulási mintamennyiséget igényelnek. A multitemplát PCR segítségével lehetővé vált a közösséget alkotó fajok örökítőanyagának sokszorosítása, amelyből az ujjlenyomat módszerekkel a közösségre egyedileg jellemző, reprodukálható mintázatokat lehet előállítani. Azonban továbbra is szinte lehetetlen, hogy minden kísérleti körülményt úgy határozzunk meg, hogy a közösségekről kapott kép tökéletesen megegyezzen a valóságos közösség szerkezetével. Már csak amiatt sem, hogy nem ismerjük a valóban ható tényezők teljes spektrumát, amely a mintafeldolgozás során az eredeti közösség szerkezetét nukleinsav összetételét befolyásolja. Feladatunk azonban minden esetben a rutinná váló módszerek és alkalmazások optimális beállítását megvalósítani. Minden új technika meghonosításánál kitérnek a módszerek előnyei mellett a rendszerek korlátaira. Jelen disszertáció is rávilágít arra, hogy elengedhetetlen a rutin alkalmazásából kapott tapasztalatok összegzése, és időnként érdemes az egyes módszereket a legújabb információk birtokában újraértékelni. Ugyanis azáltal, hogy feszegetjük egy módszer korlátait abból a célból, hogy elkerülhessük az egyértelmű hibaforrásokat, biztosan közelebb kerülünk a mikroba közösségek pontosabb megismeréséhez.

VI.1 A multitemplát PCR-alapú diverzitás elemző módszerek vizsgálata

Gombakomposzt mikrobiota megismerését célzó kísérleteken keresztül mutattuk be a nukleinsav-alapú molekuláris mintafeldolgozás során felmerülő buktatókat, és hívtuk fel a figyelmet a megfelelően megválasztott kísérleti paraméterek alapvető meghatározottságára (mint DNS kinyerés, multitemplát PCR összetétele és körülmények, molekuláris „ujjlenyomat” módszerek alkalmazása). A teljes környezeti minta-feldolgozási folyamat, és kiemelten az ún. univerzális 16S rRNS génre specifikus PCR primerek alkalmazásából eredő különbségek hátterének felderítésére tettünk kísérletet az elérhető legfrissebb 16S rRNS gén adatbázisok segítségével.

A multitemplát PCR során a kiindulási minta összetételének módosulását vizsgáltuk a PCR paraméterek változtatása mellett egy baktériumtörzsekből felállított modellrendszerben. Mesterségesen beállított templát DNS arányok segítségével PCR lépést követő T-RFLP technikával detektáltuk a PCR termékben kialakult arányokat. A modellrendszerünk megbízhatóságát és a detektálás pontosságát kísérletesen határoztuk meg, hogy a tapasztalatainkat statisztikailag megalapozottnak tekinthessük. Vizsgáltuk a templátok genomi tulajdonságainak hatását; az alkalmazott univerzális primerek, az annelációs hőmérséklet és a

PCR ciklusszám hatását a beállított templát arányokra. A modellrendszer segítségével meghatározott kulcsfontosságú PCR tényezők elemzését rizoszféra és rizoplán mintákon is elvégeztük, és ajánlásokat fogalmaztunk meg környezeti minták PCR-alapú molekuláris módszerekkel történő feldolgozásához. Az univerzális *Bacteria* domén specifikus PCR primerek akár egészen extrém szelektivitása miatt egy primerpárral a valós közösség diverzitásának csak egy bizonyos szeletéről nyerhetünk információt. Emiatt ugyanazon a környezeti mintasoron négy különböző univerzális primerpárral végeztünk PCR-DGGE molekuláris ujjlenyomat elemzéseket. Továbbá a ritka, kis abundanciájú csoportokat a DGGE mintázatok csíkokat nem tartalmazó gél területeiről próbáltuk kimutatni a PAA gélből visszanyert DNS újbóli DGGE elemzésével.

VI.2 Legfontosabb eredményeink

1. Sikeresen állítottunk fel egy négy baktériumtörzsből álló modellrendszert, amelyben T-RFLP módszerrel detektáltuk a törzsek mesterségesen beállított genomi DNS arányának változását a PCR termék összetételében (több primer és restrikciós enzim felhasználásával). Meghatároztuk az egyes törzs- primer-restrikciós enzim kombinációk esetére a T-RF detektálások mérési hibahatárát.
2. Bizonyítottuk, hogy az általunk használt ABI 310 kapilláris gél-elektroforetikus rendszerrel a templát-termék arányok módosulásának legpontosabb értékelését egyértelműen az elektroferogramok csúcsainak görbe alatti terület adatai szolgáltatják (főként a nagy hosszkülönbségű terminális fragmentumok elválasztása esetén [> 50 nukleotid]).
3. A 63F-1387R és a 27F-1387R univerzális primerpárok és több törzskombináció esetén is sikerült igazolnunk, hogy a célszekvenciával 100%-os nukleotid egyezést mutató templátok jóval nagyobb mértékben amplifikálódtak a PCR során, mint a három illeszkedési hibát (3 *mismatch*) tartalmazó templátok (63F); ezáltal súlyos preferenciális amplifikációt eredményezve. Az eredeti templát arányok változása az annelációs hőmérséklettel csaknem exponenciális összefüggést adott, azonban a preferenciális amplifikáció mértéke csökkenthető volt, és bizonyos alacsony annelációs hőmérsékleten megközelítette a pontos illeszkedéssel kapott eredményeket.
4. A modellrendszerben a templát-termék aránymódosulásokat a PCR ciklusszám változása csak kis mértékben befolyásolta; a három illeszkedési hiba hatása azonban minden ciklusszámnál erőteljesen jelentkezett.
5. A mesterségesen beállított genomi templát DNS-arányoknál nyert tapasztalatokat környezeti gyékény rizoszféra mintákon vizsgáltuk. Mindkét primerpár esetében az annelációs hőmérséklet csökkenésével egy összetettebb, több csúcsból álló T-RFLP

mintázatot kaptunk. Az egyes T-RF csúcsok egymáshoz viszonyított arányai szignifikáns eltéréseket mutattak a különböző hőmérsékleteken; extrém esetekben a magasabb annealációs hőmérsékleteken egyes csúcsok teljesen eltűntek a közösségi mintázatokból. Feltételeztük, hogy illeszkedési hibából eredő preferenciális amplifikáció szerepet játszhatott az egyes terminális fragmentumok arányainak változásában. A ciklusszámok változtatása nem eredményezett szignifikáns eltéréseket a gyékény rizoplán mikroba közösség T-RFLP ujjlenyomat mintázatában, alátámasztva ezzel a korábbi feltételezéseket, hogy diverz környezeti minták esetében a ciklusszám hatása csekély.

6. Tíz univerzális 16S rRNS génre specifikus primer esetében ellenőriztük az oligonukleotidok szekvencia azonosságát a *Ribosomal Database Project* 10.12-es verziójában található 920 643 elillesztett 16S rRNS gén szekvenciával szemben (2009. június). Az illeszkedés vizsgálatok alapján egy taxonómiai csoportokra (*phylum*) bontott saját adatbázist hoztunk létre (23. táblázat).
7. A gombakomposzt mikrobiota PCR-DGGE elemzése során a különböző univerzális primerek egészen eltérő bakteriális diverzitást tártak fel. Két *Bacteria* divízió esetében igazoltuk, hogy a csoportok sikertelen kimutatása háttérben a primerek taxononként egészen eltérő mértékű illeszkedése áll (40. ábra).
8. A négy 16S rRNS génre specifikus univerzális primerpárral különböző sávmentázati és felbontási, de egyenként reprodukálható és igen diverz DGGE mintázatot kaptunk. Összehasonlítva a külön-külön elemzett mintázatokkal a négy mintázatot együttesen vizsgált eredménnyel, arra következtettünk, hogy az együtt elemzett adatok hordozzák a valósághoz leghűbb képet az adott közösségről, és ezzel a módszerrel a „kilógó” adatokat is egyértelműen kizárhattuk. Továbbá megmutattuk, hogy a DGGE mintázatokból generált bináris adatmátrixok párhuzamosan különböző módon történő statisztikai értékelése (hierarchikus elemzés és ordináció) többlet információval szolgált, és jobban árnyalta a valós hasonlósági viszonyokat.
9. Hipotézisünket, mely szerint a DGGE gél csíkokat nem tartalmazó részeiben kis abundanciájú taxonok találhatóak, nem sikerült igazolnunk; mivel ezekből a gél részekből nem tudtunk az eredeti mintázattól eltérő csíkokat kimutatni.
10. A DGGE módszerrel az amplikonok elválása a PAA gélben messze nem tökéletes, ugyanis a denaturáló koncentrációtól függetlenül, különböző gél darabokból egy újabb DGGE elválasztással képesek voltunk a mintára jellemző teljes sáv-mintázatot előállítani. Eredményeink azt valószínűsítik, hogy egyes domináns PCR amplikonok nemcsak az általuk meghatározott csíkban, hanem a gélben bárhol előfordulhatnak.

VI.3 Ajánlások környezeti minták 16S rRNS gén alapú molekuláris feldolgozásához

Bizonyítást nyert, hogy a 16S rRNS gén vizsgálatára alapuló molekuláris diverzitás-vizsgáló módszerek eredményéből levonható ökológiai következtetéseket – ezáltal a mikroba közösségről nyerhető képet – erőteljesen meghamisíthatja a nem megfelelően ellenőrzött PCR primerek alkalmazása. Az újonnan tervezett primereket törzsek és környezeti minták genomi DNS-ével szemben PCR hatékonyság szempontjából ugyan tesztelik (Marchesi *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 2003), azonban a feltárt és jelentősnek ítélt primer illeszkedési problémákat ugyancsak figyelembe kellene venni. Egyfajta megoldást jelenthetne a primernek kismértékű módosításokkal előállított változatai keverékének használata (Frank *et al.*, 2008).

A rutin laboratóriumi munkában a PCR optimalizáció gyakran csak arra terjed ki, hogy megfelelő mennyiségű specifikus PCR terméket állítsanak elő. A PCR specifikussága érdekében szigorú, általában nagy hőmérsékletű, gyakran „touch-down” PCR hőprofilokat használnak (Muyzer *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1998; Pearce, 2005; Li *et al.*, 2009). A modellrendszerben és a környezeti rizoszféra mintákon végzett kísérleteink alapján azonban az ellenkezőjét ajánljuk: a preferenciális amplifikáció csökkentése érdekében csak akkor alkalmazzunk „touch-down” hőprofilokat, amikor aspecifikus termékek keletkezése más módon nem kerülhető el; vagy egy alacsonyabb taxonómiai kategória nagyon specifikus detektálása a cél. Az általunk megfogalmazott ajánlások környezeti minták 16S rRNS gén PCR-DGGE-alapú molekuláris módszerekkel történő feldolgozásához az alábbiakban foglalhatók össze:

DNS izolálás

- A DNS kivonás során a sejtfeltáráshoz fizikai, kémiai és enzimatisz lépések kombinációját használjuk, hogy a különböző sejtfalszerkezettel rendelkező baktériumok esetén is kellő mértékben hozzáférhetővé váljon a genomiális DNS állomány.

Multitemplát PCR körülmények

- Amennyiben célunk a minta teljes bakteriális diverzitásának feltérképezése, a PCR reakciót párhuzamosan **több univerzális primerpárral** végezzük el. A primerek pontos taxonómiai specifikusságát a legfrissebb szekvencia adatbázis adatokkal ellenőrizzük. A primerpárokat úgy válasszuk meg, hogy a *Bacteria* csoportok lehető legnagyobb mértékű lefedettségét valósítsák meg. Szűkebb spektrumú primerek esetében is elengedhetetlen az oligonukleotidok újbóli tesztelése.
- A PCR reakciót minden primerpár esetében az **annelációs hőmérséklet** szempontjából optimalizálni kell. Meg kell határozni azt a **lehető legkisebb** hőmérsékletet, amellyel sikerül specifikus terméket előállítani anélkül, hogy aspecifikus termékképződést tapasztalnánk. Ekkor még alkalmazhatunk nagyobb PCR ciklusszámot (30-32 ciklus).

- Az **optimális annelációs hőmérsékleten** újból ismételjük meg a PCR-t párhuzamos reakciókban, és használjunk **kisebb ciklusszámot** (kb. 25 ciklus), a PCR melléktermékek minimalizálása érdekében. Abban az esetben, ha kis hozamot tapasztalunk, a **párhuzamos PCR reakciók termékeit egyesíthetjük**, hogy megfelelő mennyiségű DNS álljon rendelkezésre a további elemzésekhez.
- A polimeráz enzim által meghatározott optimális hőmérsékleten a **végző extenzió 30 perc** legyen, ami a nem teljes szálak kiegészítésére, és a DGGE csíkok elválasztásánál gyakran jelentkező dupla csíkot kiküszöbölésére szolgál.
- A PCR terméket érdemes **koncentrálni**, amelyet megfelelő **tisztítási lépéssel** lehet elérni. Lehetséges a PCR termékben a keletkezett egyszálú DNS-eket enzimatikus úton eltávolítani (*Mung Bean nuclease* kezelés).

DGGE ujjlenyomat mintázat elemzés

- A DGGE sávmintázat bináris kiértékeléséhez érdemes **nem-szimmetrikus hasonlósági indexeket**, vagy a Raup és Crick valószínűségi változót használni.
- A különböző primerpárokkal kapott mintázatok adatait **egy adatmátrixként** is érdemes értékelni, ezáltal a primerek különböző csoportokkal szembeni preferenciájának hatása mérhető. A mikroba közösségről pontosabb képet kaphatunk, ha a hasonlósági adatmátrixok statisztikai kiértékelését különböző módon végezzük el és ezeket összevetjük.

A mikroba közösségek 16S rRNS gén alapú vizsgálata a mai napig a mikrobiális ökológia legjobban kutatott területének számít, és a jelen korban is megbízható a riboszómális gén elemzésére épülő taxonómia. A 16S rRNS génre alapuló molekuláris közösségelemzések számos minta egyszerre történő feldolgozására, és hihetetlenül gyors közösség-feltérképezésre ad lehetőséget. Gyakran a szűkebb specificitású vizsgálatoknál is (bizonyos taxonómiai csoportra vagy adott biológiai funkcióra specifikus elemzések) univerzális 16S rRNS génre specifikus primer-alapú elővizsgálatok szükségesek, hogy a részletesebb feldolgozás céljára (klónkönyvtár készítés, metagenom vizsgálat) mintasorokból megfelelő mintákat kiválaszthassunk. Egyetlen primerpárral messzemenő ökológiai következtetéseket nem lehet megtenni. A PCR-nél használt primerek megfelelő kiválasztásának és ellenőrzésének feltétele, hogy a publikus adatbázisokban elhelyezett szekvenciákat minőségi szempontból is folyamatosan ellenőrizzék; mivel az újonnan tervezett primerek kizárólag a már megismert szekvenciák adataira épülhetnek; és szükség van egy mindenki által egységesen alkalmazott nomenklatúrára is.

VII. IDÉZETT IRODALOM

- ABI (2000):** Applied Biosystems: Chemistry Reference for the ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Reference manual.
- Abu Al-Soud, W., Radstrom, P. (1998):** Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol.* 64(10): 3748-3753.
- Acinas, S. G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V., Polz, M. F. (2005):** PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl Environ Microbiol.* 71(12): 8966-8969.
- Ahn, C., Gillevet, P. M., Sikaroodi, M. (2007):** Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading. *Ecological Indicators.* 7(4): 852-863.
- Ahn, J. H., Kim, M. C., Shin, H. C., Choi, M. K., Yoon, S. S., Kim, T., Song, H. G., Lee, G. H., Ka, J. O. (2006):** Improvement of PCR amplification bias for community structure analysis of soil bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Biotechnol.* 16(10): 1561-1569.
- Alm, E. W., Oerther, D. B., Larsen, N., Stahl, D. A., Raskin, L. (1996):** The Oligonucleotide Probe Database. *Appl Environ Microbiol.* 62(10): 3557-3559.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997):** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A. (1990):** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* 56(6): 1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995):** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59(1): 143-169.
- Arezi, B., Xing, W., Sorge, J. A., Hogrefe, H. H. (2003):** Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. *Anal Biochem.* 321(2): 226-235.
- Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J., Weightman, A. J. (2005):** At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol.* 71(12): 7724-7736.
- Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J., Weightman, A. J. (2006):** New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol.* 72(9): 5734-5741.
- Atlas, R. M., Bej, A. K. (1994):** Polymerase Chain Reaction. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Kraig (ed.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM Press, Washington, D.C. pp. 418-435.
- Baker, G. C., Smith, J. J., Cowan, D. A. (2003):** Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods.* 55(3): 541-555.
- Baptista, J. d. C., Davenport, R. J., Donnelly, T., Curtis, T. P. (2008):** The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. *Water Res.* 42(12): 3182-3190.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, L., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L. (2008):** GenBank. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue): D25-30.
- Berta, B. (2005):** A gombakomposzt baktériumközösségének klasszikus és DNS alapú vizsgálata. *Szakdolgozat.* ELTE TTK, Budapest

Binga, E. K., Lasken, R. S., Neufeld, J. D. (2008): Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *ISME Journal*. 2(3): 233-241.

Blackwood, C. B., Oaks, A., Buyer, J. S. (2005): Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol*. 71(10): 6193-6198.

Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., Top, E. M. (2002): Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol*. 39: 101-112.

Bru, D., Martin-Laurent, F., Philippot, L. (2008): Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl Environ Microbiol*. 74(5): 1660-1663.

Calheiros, C. S. C., Duque, A. F., Moura, A., Henriques, I. S., Correia, A., Rangel, A., Castro, P. M. L. (2009): Changes in the bacterial community structure in two-stage constructed wetlands with different plants for industrial wastewater treatment. *Biore Technol*. 100(13): 3228-3235.

Casamayor, E. O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C., Muyzer, G. (2000): Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 66(2): 499-508.

Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, L., Holmstrom, C., Doolittle, W. F., Kjelleberg, S. (2007): Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*. 73(1): 278-288.

Chen, Q. J., Yin, H. Q., Luo, H. L., Xie, M., Qiu, G. Z., Liu, X. D. (2009): Micro-array based whole-genome hybridization for detection of microorganisms in acid mine drainage and bioleaching systems. *Hydrometallurgy*. 95(1-2): 96-103.

Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J., Bloch, W. (1992): Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res*. 20(7): 1717-1723.

Cline, J., Braman, J. C., Hogrefe, H. H. (1996): PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 24(18): 3546-3551.

Cochrane, G., Akhtar, R., Aldebert, P., Althorpe, N., Baldwin, A. és mtsai (2008): Priorities for nucleotide trace, sequence and annotation data capture at the Ensembl Trace Archive and the EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res*. 36(Database issue): D5-12.

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. (2009): The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 37(Database issue): D141-145.

Collins, R. E., Rocap, G. (2007): REPK: an analytical web server to select restriction endonucleases for terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res*. 35(Web Server issue): W58-62.

Crosby, L. D., Criddle, C. S. (2003): Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques*. 34(4): 790-802.

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., Wagner, M. (1999): The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol*. 22(3): 434.

Dar, S. A., Kuenen, J. G., Muyzer, G. (2005): Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 71(5): 2325-2330.

- Davis, R. E., Jomantieni, R., Kalvelyte, A., Dally, E. L. (2003):** Differential amplification of sequence heterogeneous ribosomal RNA genes and classification of the *Fragaria multicapita* phytoplasma. *Microbiol Res.* 158(3): 229-236.
- de Araujo, J. C., Schneider, R. P. (2008):** DGGE with genomic DNA: suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms. *Water Res.* 42(20): 5002-5010.
- DeJournett, T. D., Arnold, W. A., LaPara, T. M. (2007):** The characterization and quantification of methanotrophic bacterial populations in constructed wetland sediments using PCR targeting 16S rRNA gene fragments. *Appl Soil Ecology.* 35(3): 648.
- DeSantis, T., Brodie, E., Moberg, J., Zubieta, I., Piceno, Y., Andersen, G. (2007):** High-Density Universal 16S rRNA Microarray Analysis Reveals Broader Diversity than Typical Clone Library When Sampling the Environment. *Microb Ecol.* 53(3): 371-383.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G. L. (2006):** Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 72(7): 5069-5072.
- Devereux, R., Wilkinson, S. S. (2004):** Amplification of ribosomal RNA sequences. In G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. Akkermans & J. D. van Elsas (ed.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition ed. Springer. pp. 509-522.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., Mattick, J. S. (1991):** 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19(14): 4008-.
- Donachie, S. P., Foster, J. S., Brown, M. V. (2007):** Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME Journal.* 1(2): 97-99.
- Dorigo, U., Volatier, L., Humbert, J.-F. (2005):** Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.* 39(11): 2207-2218.
- Egert, M., Friedrich, M. W. (2003):** Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol.* 69(5): 2555-2562.
- el Fantroussi, S., Mahillon, J., Naveau, H., Agathos, S. N. (1997):** Introduction of anaerobic dechlorinating bacteria into soil slurry microcosms and nested-PCR monitoring. *Appl Environ Microbiol.* 63(2): 806-811.
- Ellis, R. J., Morgan, P., Weightman, A. J., Fry, J. C. (2003):** Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil. *Appl Environ Microbiol.* 69(6): 3223-3230.
- Engbreton, J. J., Moyer, C. L. (2003):** Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol.* 69(8): 4823-4829.
- Ercolini, D. (2004):** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods.* 56(3): 297-314.
- Farrelly, V., Rainey, F. A., Stackebrandt, E. (1995):** Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol.* 61(7): 2798-2801.
- Farris, M. H., Olson, J. B. (2007):** Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Lett Appl Microbiol.* 45(4): 376-381.
- Felsenstein, J. (1985):** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39(4): 783-791.

Felske, A., Rheims, H., Wolterink, A., Stackebrandt, E., Akkermans, A. D. (1997): Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology*. 143 (Pt 9): 2983-2989.

Ferris, M. J., Muyzer, G., Ward, D. M. (1996): Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol.* 62(2): 340-346.

Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., Jackson, R. B. (2005): Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol.* 71(7): 4117-4120.

Fisher, M. M., Triplett, E. W. (1999): Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Appl Environ Microbiol.* 65(10): 4630-4636.

Forney, L. J., Zhou, X., Brown, C. J. (2004): Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr Opin Microbiol.* 7(3): 210-220.

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., Olsen, G. J. (2008): Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 74(8): 2461-2470.

Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., Simonet, P. (1999): Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl Environ Microbiol.* 65(12): 5409-5420.

Fuerst, J. A. (2004): Planctomycetes - a phylum of emerging interest for microbial evolution and ecology. *In* WFCC Newsletter, pp. 1-11.

Gagnon, V., Chazarenc, F., Comeau, Y., Brisson, J. (2007): Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands. *Water Sci Technol.* 56(3): 249-254.

Garcia-Martinez, J., Acinas, S. G., Anton, A. I., Rodriguez-Valera, F. (1999): Use of the 16S--23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol Methods.* 36(1-2): 55-64.

Gargas, A., DePriest, P. T. (1996): A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. *Mycologia.* 88(5): 745-748.

Gerrits, J. P. G. (1988): Nutrition and compost. *In* L. J. L. D. van Griensven (ed.), *The cultivation of mushrooms*, vol. First English edition. Darlington Mushroom Laboratories, Rustington, UK. pp. 29-72.

Gilbride, K. A., Lee, D. Y., Beaudette, L. A. (2006): Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J Microbiol Methods.* 66(1): 1-20.

Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., Field, K. G. (1990): Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature.* 345(6270): 60-63.

Girvan, M. S., Bullimore, J., Pretty, J. N., Osborn, A. M., Ball, A. S. (2003): Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl Environ Microbiol.* 69(3): 1800-1809.

Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., Bailey, M. J. (2000): Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol.* 66(12): 5488-5491.

Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., Bailey, M. J. (2003): Influence of depth and sampling time on bacterial community structure in an upland grassland soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 43(1): 35-43.

Grimes, D. J., Atwell, R. W., Brayton, P. R., Palmer, L. M., Rollins, D. M., Roszak, D. B., Singleton, F. L., Tamplin, M. L., Colwell, R. R. (1986): The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiol Sci.* 3(11): 324-329.

- Hall, N. (2007):** Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol.* 210(9): 1518-1525.
- Hamady, M., Knight, R. (2009):** Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res.* 19(7): 1141-1152.
- Hammer, O., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001):** PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 4(1): 9.
- Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S. (1998):** Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol Ecol.* 26(2): 141-149.
- Hao, C.-b., Zhang, H.-x., Bai, Z.-h., Hu, Q., Zhang, B.-g. (2007):** A novel acidophile community populating waste ore deposits at an acid mine drainage site. *J Environ Sci.* 19(4): 444-450.
- Hartmann, M., Enkerli, J., Widmer, F. (2007):** Residual polymerase activity-induced bias in terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Environ Microbiol.* 9(2): 555-559.
- Hartmann, M., Widmer, F. (2008):** Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiling. *FEMS Microbiol Ecol.* 63(2): 249-260.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E. M. (1997):** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol.* 63(8): 3233-3241.
- Hewson, I., Fuhrman, J. A. (2004):** Richness and Diversity of Bacterioplankton Species along an Estuarine Gradient in Moreton Bay, Australia. *Appl Environ Microbiol.* 70(6): 3425-3433.
- Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., Moffett, B. F. (2003):** Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 43(1): 1-11.
- Hiraishi, A. (1999):** Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. *J Biosci Bioeng.* 88(5): 449-460.
- Holben, W. E., Jansson, J. K., Chelm, B. K., Tiedje, J. M. (1988):** DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. *Appl Environ Microbiol.* 54(3): 703-711.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M., Kudo, T. (2003):** Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol Lett.* 221(2): 299-304.
- Hubert, C., Shen, Y., Voordouw, G. (2005):** Changes in soil microbial community composition induced by cometabolism of toluene and trichloroethylene. *Biodegradation.* 16(1): 11-22.
- Isenbarger, T. A., Finney, M., Rios-Velazquez, C., Handelsman, J., Ruvkun, G. (2008):** Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Appl Environ Microbiol.* 74(3): 840-849.
- Ishii, K., Fukui, M. (2001):** Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol.* 67(8): 3753-3755.
- Janse, I., Bok, J., Zwart, G. (2004):** A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods.* 57(2): 279-281.
- Jany, J.-L., Barbier, G. (2008):** Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol.* 25(7): 839-848.
- Jensen, M. A., Straus, N. (1993):** Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Appl.* 3(3): 186-194.

Justé, A., Thomma, B. P. H. J., Lievens, B. (2008): Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol.* 25(6): 745-761.

Kainz, P., Schmiedlechner, A., Strack, H. B. (1992): In vitro amplification of DNA fragments > 10 kb. *Anal Biochem.* 202(1): 46-49.

Kainz, P. (2000): The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta.* 1494(1-2): 23-27.

Kanagawa, T. (2003): Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng.* 96(4): 317-323.

Kaplan, C. W., Kitts, C. L. (2003): Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J Microbiol Methods.* 54(1): 121-125.

Kaufman, M. G., Chen, S., Walker, E. D. (2008): Leaf-associated bacterial and fungal taxa shifts in response to larvae of the tree hole mosquito, *Ochlerotatus triseriatus*. *Microb Ecol.* 55(4): 673-684.

Kisand, V., Wikner, J. (2003): Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *J Microbiol Methods.* 54(2): 183-191.

Klammer, S., Knapp, B., Insam, H., Dell'Abate, M. T., Ros, M. (2008): Bacterial community patterns and thermal analysis of composts of various origins. *Waste Management and Research.* 26(2): 173.

Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., Schmidt, T. M. (2000): rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 66(4): 1328-1333.

Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., Schmidt, T. M. (2001): rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res.* 29(1): 181-184.

Knapp, B. A., Seeber, J., Podmirsej, S. M., Rief, A., Meyer, E., Insam, H. (2009): Molecular fingerprinting analysis of the gut microbiota of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda). *Pedobiologia.* 52(5): 325-336.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Sthlberg, A., Zoric, N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine.* 27(2-3): 95-125.

Lakay, F. M., Botha, A., Prior, B. A. (2007): Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *J Appl Microbiol.* 102(1): 265-273.

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R. (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(20): 6955-6959.

Lane, D. J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd., London. pp. 115-147.

Larkin, M. J., Osborn, A. M., Fairley, D. (2005): A molecular toolbox for bacterial ecologists: PCR primers for functional gene analysis. In A. M. Osborn & C. J. Smith (ed.), *Molecular Microbial Ecology*. Taylor & Francis Group pp. 281-301.

Lee, Z. M., Bussema, C., 3rd, Schmidt, T. M. (2009): rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue): D489-493.

Li, H., Zhang, Y., Li, D.-s., Xu, H., Chen, G.-x., Zhang, C.-g. (2009): Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for fingerprinting of microbial communities in paddy soils. *Soil Biol Biochem.* 41(5): 954-968.

Li, J., Wen, Y., Zhou, Q., Xingjie, Z., Li, X., Yang, S., Lin, T. (2008): Influence of vegetation and substrate on the removal and transformation of dissolved organic matter in horizontal subsurface-flow constructed wetlands. *Biore Technol.* 99(11): 4990-4996.

- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 63(11): 4516-4522.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenes, J. P., Godon, J. J. (2006): Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ Microbiol.* 8(4): 720-731.
- Loy, A., Kusel, K., Lehner, A., Drake, H. L., Wagner, M. (2004): Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages. *Appl Environ Microbiol.* 70(12): 6998-7009.
- Loy, A., Maixner, F., Wagner, M., Horn, M. (2007): probeBase--an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue): D800-804.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H. és mtsai (2004): ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32(4): 1363-1371.
- Lueders, T., Friedrich, M. W. (2003): Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol.* 69(1): 320-326.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T., Jr., Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M. (2000): The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28(1): 173-174.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. (2008): The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ Int.* 34(2): 265-276.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K. H. (1992): Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria-problems and solutions. *Syst Appl Microbiol.* 15(4): 593-600.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., Dymock, D., Wade, W. G. (1998): Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 64(2): 795-799.
- Márialigeti, K., Contreras, E., Barabás, G., Heydrich, M., Szabó, I. M. (1985): True intestinal actinomycetes of millipedes (diplopoda) *J Invertebr Pathol.* 45(1): 120-121.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002): Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal.* 16(1): 47-51.
- Mathieu-Daude, F., Welsh, J., Vogt, T., McClelland, M. (1996): DNA rehybridization during PCR: the 'Cot effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res.* 24(11): 2080-2086.
- McCaig, A. E., Glover, L. A., Prosser, J. I. (2001): Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Appl Environ Microbiol.* 67(10): 4554-4559.
- Mills, D. K., Entry, J. A., Voss, J. D., Gillevet, P. M., Mathee, K. (2006): An assessment of the hypervariable domains of the 16S rRNA genes for their value in determining microbial community diversity: the paradox of traditional ecological indices. *FEMS Microbiol Ecol.* 57(3): 496-503.
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G. J. (1999): Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and Fcomparision with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 65(8): 3518-3525.

- Moura, A., Tacão, M., Henriques, I., Dias, J., Ferreira, P., Correia, A. (2009):** Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR-DGGE analysis. *Microbiol Res.* 164(5): 560-569.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.* 51 Pt 1: 263-273.
- Murray, A. E., Hollibaugh, J. T., Orrego, C. (1996):** Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl Environ Microbiol.* 62(7): 2676-2680.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993):** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59(3): 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998):** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73(1): 127-141.
- Myers, R. M., Larin, Z., Maniatis, T. (1985):** Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science.* 230(4731): 1242-1246.
- Nichols, D. (2007):** Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol Ecol.* 60(3): 351-357.
- Nikolausz, M. (2003):** Molekuláris biodiverzitás elemzési módszerek a környezeti mikrobiológiában és alkalmazásuk a rizoszféra-rizoplán mikrobaközösségek vizsgálatára. *Doktori értekezés.* ELTE TTK, Budapest
- Nikolausz, M., Márialigeti, K., Kovács, G. (2004):** Comparison of RNA- and DNA-based species diversity investigations in rhizoplane bacteriology with respect to chloroplast sequence exclusion. *J Microbiol Methods.* 56(3): 365-373.
- Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A., Márialigeti, K. (2005):** Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiol Lett.* 244(2): 385-390.
- Nilsson, A. I., Koskineimi, S., Eriksson, S., Kugelberg, E., Hinton, J. C. D., Andersson, D. I. (2005):** Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(34): 12112-12116.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A. K. (2007):** Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb Ecol.* 54(2): 276-289.
- Normander, B., Prosser, J. I. (2000):** Bacterial Origin and Community Composition in the Barley Phytosphere as a Function of Habitat and Presowing Conditions. *Appl Environ Microbiol.* 66(10): 4372-4377.
- Nunan, N., Daniell, T. J., Singh, B. K., Papert, A., McNicol, J. W., Prosser, J. I. (2005):** Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl Environ Microbiol.* 71(11): 6784-6792.
- Nunan, N., Singh, B., Reid, E., Ord, B., Papert, A., Squires, J., Prosser, J. I., Wheatley, R. E., McNicol, J., Millard, P. (2006):** Sheep-urine-induced changes in soil microbial community structure. *FEMS Microbiol Ecol.* 56(2): 310-320.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996):** Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 178(19): 5636-5643.
- Nyssonen, M., Kapanen, A., Piskonen, R., Lukkari, T., Itavaara, M. (2009):** Functional genes reveal the intrinsic PAH biodegradation potential in creosote-contaminated groundwater following in situ biostimulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84(1): 169-182.

- Ochman, H., Davalos, L. M. (2006):** The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science*. 311(5768): 1730-1733.
- Ogram, A., Sayler, G. S., Barkay, T. (1987):** The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods*. 7(2-3): 57-66.
- Ogram, A. (2000):** Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. *Soil Biol Biochem*. 32(11-12): 1499-1504.
- Okano, Y., Hristova, K. R., Leutenegger, C. M., Jackson, L. E., Denison, R. F., Gebreyesus, B., Lebauer, D., Scow, K. M. (2004):** Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol*. 70(2): 1008-1016.
- Oravecz, O., Nyírő, G., Márialigeti, K. (2002):** A molecular approach in the analysis of the faecal bacterial community in an African millipede belonging to the family Spirostreptidae (Diplopoda). *Eur J Soil Biol*. 38(1): 67-70.
- Osborn, A. M., Moore, E. R., Timmis, K. N. (2000):** An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol*. 2(1): 39-50.
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F. L., Torsvik, V. (1997):** Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 63(9): 3367-3373.
- Pandey, J., Ganesan, K., Jain, R. K. (2007):** Variations in T-RFLP profiles with differing chemistries of fluorescent dyes used for labeling the PCR primers. *J Microbiol Methods*. 68(3): 633-638.
- Pearce, D. A., van der Gast, C. J., Lawley, B., Ellis-Evans, J. C. (2003):** Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *FEMS Microbiol Ecol*. 45(1): 59-70.
- Pearce, D. A. (2005):** The structure and stability of the bacterioplankton community in Antarctic freshwater lakes, subject to extremely rapid environmental change. *FEMS Microbiol Ecol*. 53(1): 61-72.
- Penn, M., Dworkin, M. (1976):** Robert Koch and two visions of microbiology. *Bacteriol Rev*. 40(2): 276-283.
- Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F., Tebbe, C. C. (2000):** Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*. 66(3): 930-936.
- Pinard, R., de Winter, A., Sarkis, G. J., Gerstein, M. B., Tartaro, K. R., Plant, R. N., Egholm, M., Rothberg, J. M., Leamon, J. H. (2006):** Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics*. 7: 216.
- Podani, J. (1997):** *Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeldtárás rejtelmeibe*. Budapest: Scientia Kiadó
- Polz, M. F., Cavanaugh, C. M. (1998):** Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol*. 64(10): 3724-3730.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W. G., Peplies, J., Glockner, F. O. (2007):** SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*. 35(21): 7188-7196.
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P., Wagner, M. (2000):** Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol*. 66(12): 5368-5382.

- Qiu, X., Wu, L., Huang, H., McDonel, P. E., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., Zhou, J. (2001):** Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol.* 67(2): 880-887.
- Radajewski, S., Webster, G., Reay, D. S., Morris, S. A., Ineson, P., Nedwell, D. B., Prosser, J. I., Murrell, J. C. (2002):** Identification of active methylophilic populations in an acidic forest soil by stableisotope probing. *Microbiology.* 148: 2331-2342.
- Ramette, A. (2007):** Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 62(2): 142-160.
- Raup, D. M., Crick, R. E. (1979):** Measurement of faunal similarity in paleontology. *J Paleo.* 53: 1213-1227.
- Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S., Pace, N. R. (1992):** Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 58(10): 3417-3418.
- Ritz, K. (2007):** The plate debate: cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 60(3): 358-362.
- Robinson, C. R., Sligar, S. G. (1993):** Molecular recognition mediated by bound water. A mechanism for star activity of the restriction endonuclease EcoRI. *J Mol Biol.* 234(2): 302-306.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1994):** In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology.* 140 (Pt 10): 2849-2858.
- Rowan, A. K., Moser, G., Gray, N., Snape, J. R., Fearnside, D., Curtis, T. P., Barer, M. R., Head, I. M. (2003):** A comparative study of ammonia-oxidizing bacteria in lab-scale industrial wastewater treatment reactors. *Water Sci Technol.* 48(3): 17-24.
- Ruiz-Rueda, O., Hallin, S., Bañeras, L. (2009):** Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. *FEMS Microbiol Ecol.* 67(2): 308-319.
- Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhachova, K., Forstova, J., Kopecky, J. (2008):** Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl Environ Microbiol.* 74(9): 2902-2907.
- Saikaly, P. E., Stroot, P. G., Oerther, D. B. (2005):** Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl Environ Microbiol.* 71(10): 5814-5822.
- Saitou, N., Nei, M. (1987):** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4): 406-425.
- Sambrook, J. E., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989):** *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D., Saarela, M., De Vos, W. M. (2001):** Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of fecal bifidobacterium populations in a prebiotic and probiotic feeding trial. *Syst Appl Microbiol.* 24(2): 227-231.
- Sauer, P., Müller, M., Kang, J. (1998):** Quantitation of DNA. In Qiagen News, pp. 23-26
- Schafer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R., Stackebrandt, E., Troussellier, M., Guindulain, T., Vives-Rego, J., Muyzer, G. (2001):** Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol.* 34(3): 243-253.
- Schmalenberger, A., Tebbe, C. C. (2003):** Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Mol Ecol.* 12(1): 251-262.

- Schütte, U. M., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D., Forney, L. J. (2008): Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80(3): 365-380.
- Schwieger, F., Tebbe, C. C. (1998): A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol.* 64(12): 4870-4876.
- Sekido, T., Bodelier, P. L., Shoji, T., Suwa, Y., Laanbroek, H. J. (2008): Limitations of the use of group-specific primers in real-time PCR as appear from quantitative analyses of closely related ammonia-oxidising species. *Water Res.* 42(4-5): 1093-1101.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., Uchiyama, H. (2001): A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol Lett.* 23(15): 1205-1208.
- Shannon, C. E., Weaver, W. (1949): *The mathematical theory of communication*. Urbana: Univ. Illinois Press
- Shyu, C., Soule, T., Bent, S. J., Foster, J. A., Forney, L. J. (2007): MiCA: A web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microb Ecol.* 53: 562 - 570.
- Singh, B. K., Nazaries, L., Munro, S., Anderson, I. C., Campbell, C. D. (2006): Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. *Appl Environ Microbiol.* 72: 7278 - 7285.
- Sipos, R. (2002): Mesterséges lápon élő széleslevelű gyékény (*Typha latifolia*) rizoszféra baktérium-közösségek vizsgálata molekuláris ujjlenyomat módszerekkel. *Szakdolgozat*. ELTE TTK, Budapest
- Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., Nikolausz, M. (2007): Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol Ecol.* 60(2): 341-350.
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., Tebbe, C. C. (2007): Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *J Microbiol Methods.* 69(3): 470-479.
- Sneath, P. H., Sokal, R. R. (1962): Numerical taxonomy. *Nature.* 193: 855-860.
- Sokal, R. R., Michener, C. D. (1958): A statistical method for evaluating systematic relationships. In *University of Kansas Scientific Bulletin*, pp. 1409-1438
- Song, J., Weon, H. Y., Yoon, S. H., Park, D. S., Go, S. J., Suh, J. W. (2001): Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 202(1): 97-102.
- Sorensen, J., Haubjerg Nicolaisen, M., Ron, E., Simonet, P. (2009): Molecular tools in rhizosphere microbiology—from single-cell to whole-community analysis. *Plant and Soil.* 321(1): 483-512.
- Soria-Carrasco, V., Valens-Vadell, M., Pena, A., Anton, J., Amann, R., Castresana, J., Rossello-Mora, R. (2007): Phylogenetic position of *Salinibacter ruber* based on concatenated protein alignments. *Syst Appl Microbiol.* 30(3): 171-179.
- Speksnijder, A. G., Kowalchuk, G. A., De Jong, S., Kline, E., Stephen, J. R., Laanbroek, H. J. (2001): Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol.* 67(1): 469-472.
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M. (1994): Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 44(4): 846-849.

Stafford, W. H., Baker, G. C., Brown, S. A., Burton, S. G., Cowan, D. A. (2005): Bacterial diversity in the rhizosphere of Proteaceae species. *Environ Microbiol.* 7(11): 1755-1768.

Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R. (1985): Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol.* 49(6): 1379-1384.

Staley, J. T., Konopka, A. (1985): Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* 39: 321-346.

Strom, P. F. (1985): Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Appl Environ Microbiol.* 50(4): 906-913.

Suzuki, M. T., Giovannoni, S. J. (1996): Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 62(2): 625-630.

Székely, A. J., Sipos, R., Berta, B., Vajna, B., Hajdu, C., Márialigeti, K. (2009): DGGE and T-RFLP Analysis of Bacterial Succession during Mushroom Compost Production and Sequence-aided T-RFLP Profile of Mature Compost. *Microb Ecol.* 57(3): 522-533.

Takaku, H., Kodaira, S., Kimoto, A., Nashimoto, M., Takagi, M. (2006): Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. *J Biosci Bioeng.* 101(1): 42.

Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004): Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(30): 11030-11035.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24(8): 1596-1599.

Tebbe, C. C., Vahjen, W. (1993): Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol.* 59(8): 2657-2665.

Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., Swings, J. (2003): Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 69(1): 220-226.

Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G., Ramsing, N. B. (1996): Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol.* 62(4): 1405-1415.

Teske, A., Sorensen, K. B. (2008): Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME Journal.* 2(1): 3-18.

Torsvik, V., Goksoyr, J., Daee, F. L. (1990): High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 56(3): 782-787.

Torsvik, V., Ovreas, L. (2002): Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* 5(3): 240-245.

Tringe, S. G., Hugenholtz, P. (2008): A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol.* 11(5): 442-446.

Tyler, K. D., Wang, G., Tyler, S. D., Johnson, W. M. (1997): Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol.* 35(2): 339-346.

von Wintzingerode, F., Gobel, U. B., Stackebrandt, E. (1997): Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev.* 21(3): 213-229.

- Wang, C. M., Shyu, C. L., Ho, S. P., Chiou, S. H. (2007):** Species diversity and substrate utilization patterns of thermophilic bacterial communities in hot aerobic poultry and cattle manure composts. *Microb Ecol.* 54(1): 1-9.
- Wang, G. C., Wang, Y. (1997):** Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol.* 63(12): 4645-4650.
- Wang, J., Ma, T., Zhao, L., Lv, J., Li, G., Liang, F., Liu, R. (2008):** PCR-DGGE method for analyzing the bacterial community in a high temperature petroleum reservoir. *World J Microbiol Biotechnol.* 24(9): 1981-1987.
- Watanabe, K., Kodama, Y., Harayama, S. (2001):** Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J Microbiol Methods.* 44(3): 253-262.
- Webster, G., Newberry, C. J., Fry, J. C., Weightman, A. J. (2003):** Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *J Microbiol Methods.* 55(1): 155-164.
- Woese, C. R. (1987):** Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51(2): 221-271.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990):** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(12): 4576-4579.
- Wu, L., Liu, X., Schadt, C. W., Zhou, J. (2006):** Microarray-based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs by using whole-community genome amplification. *Appl Environ Microbiol.* 72(7): 4931-4941.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Ludwig, W., Glöckner, F. O., Rosselló-Móra, R. (2008):** The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol.* 31(4): 241-250.
- Zelles, L. (1999):** Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fertil Soils.* 29(2): 111-129.
- Zhang, X., Yan, X., Gao, P., Wang, L., Zhou, Z., Zhao, L. (2005):** Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *J Microbiol Methods.* 60(1): 1-11.
- Zhou, J. (2003):** Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr Opin Microbiol.* 6(3): 288-294.
- Zwirgmaier, K. (2005):** Fluorescence in situ hybridisation (FISH) - the next generation. *FEMS Microbiol Lett.* 246(2): 151-158.

VIII. ÖSSZEFOGLALÓ

A mikroba közösségek molekuláris feldolgozásának minden egyes eleme hibalehetőségeket rejt magában, ennek a multitemplát PCR lépés több szempontból is a legkritikusabb lépése. Esetenként akár több ezerféle DNS templát esetében ismert a PCR szaporítás során fellépő differenciális amplifikáció jelensége, amely az eredeti mikroba közösségben fellelhető arányokat módosítja, és ezáltal jelentősen befolyásolja a közösség diverzitásáról kapott képet. Törekednünk kell a PCR-ben lejátszódó folyamatok pontos megismerésére, hogy a PCR paramétereket ne csupán az elvárt hozam alapján válasszuk meg.

A mikrobiális ökológiában rutinszerűen alkalmazott nukleinsav-alapú molekuláris „ujjlenyomat” módszerek alapját képező multitemplát PCR templát-termék aránymódosulásait vizsgáltuk egy mesterséges baktériumtörzsekből álló modellrendszerben, és növényi rizoszféra mintákon. A modellrendszerben T-RFLP módszerrel detektáltuk a törzsek beállított genomi DNS arányának változását a PCR termék összetételében, és meghatároztuk az egyes törzs, primer, és restriktációs enzim kombináció esetére a mérési hibahatárokat. Igazoltuk, hogy rendszerünkben a T-RF csúcsok görbe alatti területeivel kell számolni.

Vizsgáltuk a templátok genomi tulajdonságainak, az alkalmazott univerzális primerek, az annelációs hőmérséklet és a PCR ciklusszám hatását a beállított templát arányokra. Bizonyítottuk, hogy (a primer és a templát szekvenciája között) három illeszkedési hibával rendelkező genomiális DNS-sel szemben a 100%-os illeszkedést adó templátok a PCR során preferenciálisan amplifikálódtak, és ennek mértéke az annelációs hőmérséklettel csaknem exponenciális. Az illeszkedési hiba jóval jelentősebb aránymódosulást eredményezett, mint a genomi tulajdonságok különbségéből adódó hatás; valamint a PCR ciklusszám változásának hatása a modellrendszer és a környezeti minták esetében egyaránt is csak csekély mértékben jelentkezett. A rizoszféra minták T-RFLP elemzése során azt tapasztaltuk, hogy mindkét primerpár esetében az annelációs hőmérséklet emelésével a detektálható bakteriális diverzitás csökkent, a T-RF csúcsok egymáshoz viszonyított terület arányai jelentősen módosultak, sőt magas hőmérsékleten bizonyos csúcsok teljesen eltűntek a közösségi ujjlenyomat mintázatokból.

Gombakomposzt mikrobiota elemzésén keresztül igazoltuk, hogy a nem megfelelően alkalmazott PCR körülmények megválasztásával hamis ökológiai következtetésekre juthatunk. A legfrissebb RDP 16S rRNS gén szekvencia adatbázis segítségével 10 univerzális 16S rRNS génre specifikus primer esetében végeztünk el illeszkedés vizsgálatot, ami alapján egy taxonómiai csoportokra bontott saját adatbázist hoztunk létre. A kapott eredményekkel két *Bacteria* divízió esetében bizonyítottuk a primerek illeszkedési hibájának összefüggését az adott csoportok DGGE mintázatokban megnyilvánuló hiányával.

Az univerzális primerek akár egészen extrém szelektivitása miatt egy 16 mintából álló környezeti mintasoron négy univerzális primerpárral végeztünk PCR-DGGE elemzéseket és megmutattuk, hogy a négy primerpárral kapott mintázatok egyben elemezve kaptuk az adott közösségről a legpontosabb képet. Bár hipotézisünket, mely szerint a DGGE gél csíkokat nem tartalmazó részeiben kis abundanciájú taxonok találhatók, nem sikerült igazolnunk, bizonyítottuk, hogy a domináns PCR amplikonok a gélben bárhol előfordulhatnak.

Eredményeink alapján ajánljuk az illeszkedési problémák figyelembevételét az újonnan tervezett és a már meglévő primerek tesztelésénél egyaránt, illetve javasoljuk a primer illeszkedések rendszeres felülvizsgálatát. Továbbá, a rutin PCR alkalmazásokhoz a lehető legalacsonyabb annelációs hőmérsékletet és a *touch-down* hőprofilok mellőzését ajánljuk.

IX. SUMMARY

Each step of the molecular biological investigation of microbial communities may contain errors, but the most critical of all is the multitemplate PCR step. The manifestation of differential amplification was experienced in the case of DNA templates of several thousand different kinds, which can alter the proportions of the original microbial communities, and therefore significantly affect the picture that can be obtained from the diversity of the given community. We have to strive to know the exact processes taking place during PCR, so that PCR parameters would not only be chosen primarily in the hope of good PCR product yields.

We investigated the nucleic acid based molecular fingerprinting techniques and their foundation, the multitemplate PCR, and analyzed the distortions of the template-to-product ratios during PCR in a model community and environmental rhizosphere samples. We detected the alteration of the set genomic DNA template ratios of the strains in the PCR product in the model community using T-RFLP method, and were able to determine the margin of error for the different bacterial strain-primer-restriction enzyme combinations. We justified that the peak area data of a given T-RF peak has to be used for calculations in our system.

We investigated the effect of genomic properties of the templates, the applied universal primers, the annealing temperature and the number of PCR cycles on the preset template ratios. We have proved that templates with a perfect match (100%) with the applied primer are preferentially amplified over templates containing three mismatches against the primer sequence, and the nature of this relationship is almost exponential with respect to the increase of annealing temperature. The effect of primer-template mismatches resulted in a more significant change in template ratios, than genomic properties and the effect of the number of PCR cycles was also marginal in case of both the model system and the environmental samples. We experienced during the T-RFLP analyses of rhizosphere samples a decrease in bacterial diversity with the increase of annealing temperature in the case of both primer sets applied. The peak area ratios of the T-RF peaks changed considerably, some peaks even completely disappeared from the community fingerprinting pattern at very high annealing temperatures.

We showed through the investigation of the mushroom compost bacterial community, that the careless application of PCR circumstances, could lead to false ecological conclusions. We built our own taxonomically grouped database according to the latest update of the RDP 16S rRNA gene sequence database, based on the alignment of 10 universal 16S rRNA specific primers. We proved in two instances of *Bacteria* divisions that the existing primer mismatches could be related to the absence of these bacterial groups from DGGE fingerprinting patterns.

Due to the sometimes extremely different specificity of universal primers, we carried out PCR-DGGE analysis with a time-series of 16 environmental samples with four universal primer pairs, and proved that the concatenated data analysis of all four primer pairs resulted in the most precise overall picture of the microbial community. Although we were unable to prove our hypothesis that DGGE gel areas exempt from bands contained bacterial taxa of low abundance; we could prove that dominant PCR amplicons could be present everywhere within the gel regardless of the denaturant range.

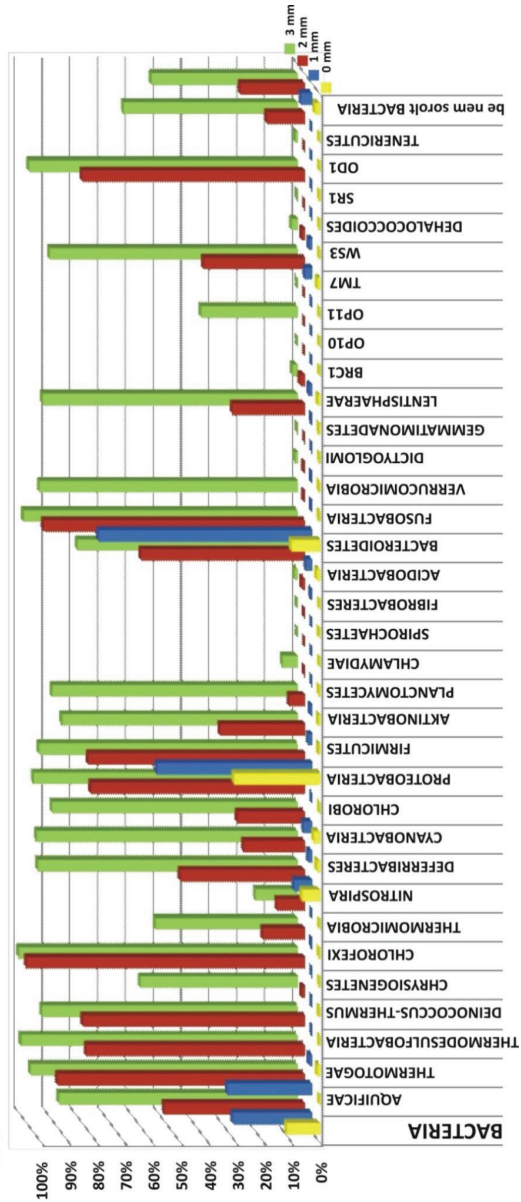
We recommend on the basis of our results the consideration of primer mismatches during the testing existing and newly designed primers alike, with the regular revision of primer mismatches. Furthermore, we recommend using the lowest annealing temperature and omitting *touch down* protocols wherever possible during routine PCR applications.

X. FÜGGELÉK

X.1 A 63F primer illeszkedése a *Bacteria* divíziók 16S szekvenciáihoz (RDP 10.12)

40. ábra. A 63F primer *in silico* illeszkedése a *Bacteria* domén és a benne foglalt 34 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a *Probe Match* alapján). A megadott százalékos értékek a különböző mértékben illeszkedő szekvenciák arányát jelölik az összes olyan „jó minőségű” szekvenciához viszonyítva, amely az *E. coli* 43-63 tartományban nukleotidot tartalmaz (427 627 db 16S rRNS gén szekvencia). A megengedhető illeszkedési hibák (*mismatch*) száma: 0 mm = tökéletes vagy 100%-os illeszkedés (sárga); 1 mm = maximum 1 db illeszkedési hiba (kék); 2 mm = maximum 2 db illeszkedési hiba (piros); 3 mm = maximum 3 db illeszkedési hiba (zöld)

63F



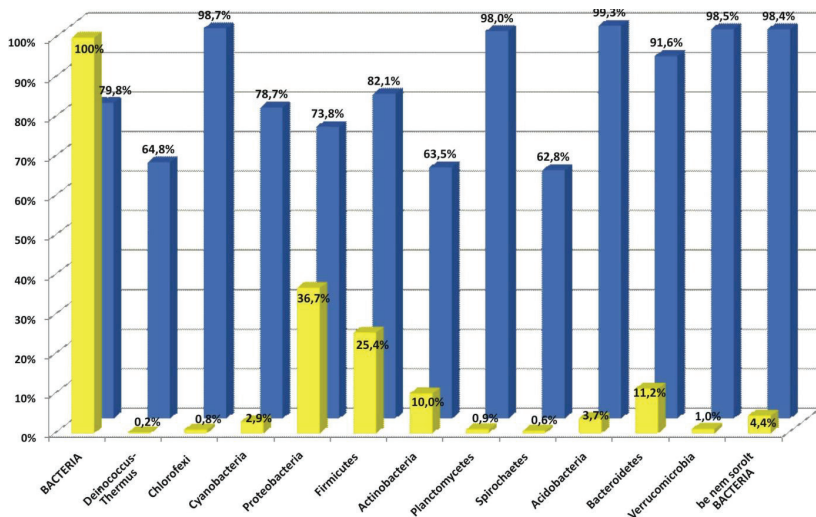
X.2 Adatbázis 10 univerzális 16S rRNS génre specifikus primer illeszkedésvizsgálata

23. Táblázat. Az RDP-II 10.12-es verziója alapján az adatbázis 920 643 elillesztett 16S rRNS szekvencia megoszlása a *Bacteria* és *Archaea* doméneknek belül.

A különböző „univerzális” 16S rRNS gén primerek illeszkedése az adatbázisban szereplő „jó minőségű” szekvenciákhoz a *Probe Match* alapján.

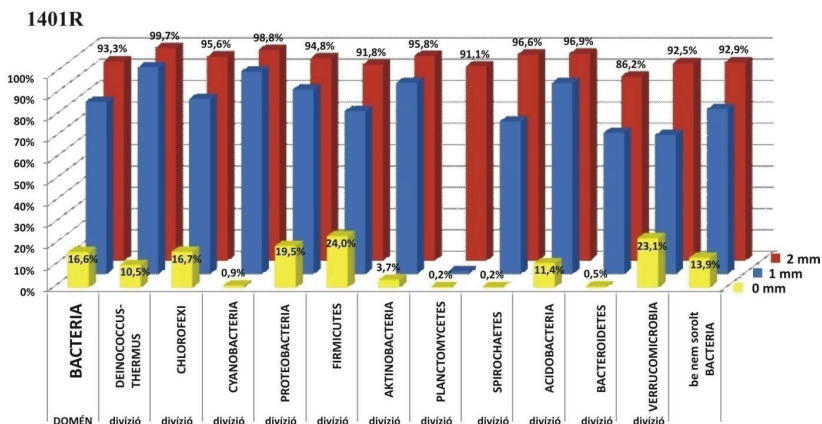
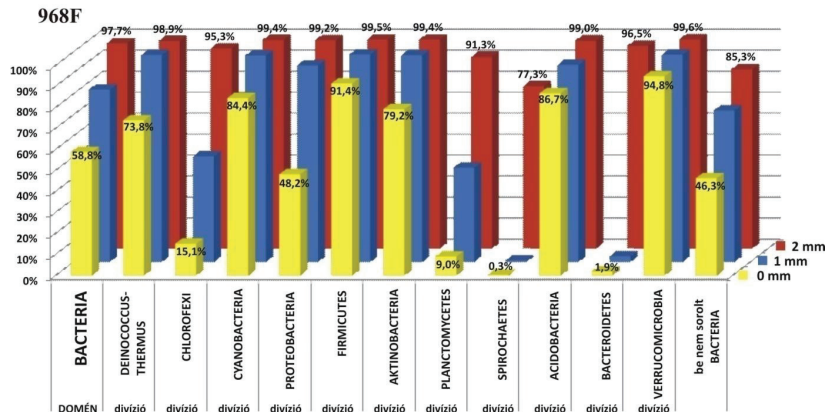
^a az adatbázisban szereplő összes 16S rRNS szekvencia; ^b primerrel megadott értékek a különböző metekken illeszkedő szekvenciák százalékos arányát jelölik az összes olyan „*jo*” minőségű szekvenciához viszonyítva, amely tartalmaz nukleotidokat az adott primárral fedett *E. coli* pozíciókban. A primerrel jelölése megfelel a táblázatban szereplő oligonukleotidoknak.

REP-H 10.12 (2008.02)	BACTERIA	ALC 165										63F										338R										341F										534R										907R										968F										1387R										1401R										1492R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
		b										c										d										e										f										g										h										i										j										k										l										m										n										o										p										q										r										s										t										u										v										w										x										y										z										aa										ab										ac										ad										ae										af										ag										ah										ai										aj										ak										al										am										an										ao										ap										aq										ar										as										at										au										av										aw										ax										ay										az										ba										bb										bc										bd										be										bf										bg										bh										bi										bj										bk										bl										bm										bn										bo										bp										bq										br										bs										bt										bu										bv										bw										bx										by										bz										ca										cb										cc										cd										ce										cf										cg										ch										ci										cj										ck										cl										cm										cn										co										cp										cq										cr										cs										ct										cu										cv										cw										cx										cy										cz										da										db										dc										dd										de										df										dg										dh										di										dj										dk										dl										dm										dn										do										dp										dq										dr										ds										dt										du										dv										dw										dx										dy										dz										ea										eb										ec										ed										ee										ef										eg										eh										ei										ej										ek										el										em										en										eo										ep										eq										er										es										et										eu										ev										ew										ex										ey										ez										fa										fb										fc										fd										fe										ff										fg										fh										fi										fj										fk										fl										fm										fn										fo										fp										fq										fr										fs										ft										fu										fv										fw										fx										fy										fz										ga										gb										gc										gd										ge										gf										gg										gh										gi										gj										gk										gl										gm										gn										go										gp										gq										gr										gs										gt										gu										gv										gw										gx										gy										gz										ha										hb										hc										hd										he										hf										hg										hh										hi										hj										hk										hl										hm										hn										ho										hp										hq										hr										hs										ht										hu										hv										hw										hx										hy										hz										ia										ib										ic										id										ie										if										ig										ih										ii										ij										ik										il										im										in										io										ip										iq										ir										is										it										iu										iv										iw										ix										iy										iz										ja										jb										jc										jd										je										jf										jg										jh										ji										jj										jk										jl										jm										jn										jo										jp										jq										jr										js										jt										ju										jv										jw										jx										jy										jz										ka										kb										kc										kd										ke										kf										kg										kh										ki										kj										kk										kl										km										kn										ko										kp										kq										kr										ks										kt										ku										kv										kw										kx										ky										kz										la										lb										lc										ld										le										lf										lg										lh										li										lj										lk										ll										lm										ln										lo										lp										lq										lr										ls										lt										lu										lv										lw										lx										ly										lz										ma										mb										mc										md										me										mf										mg										mh										mi										mj										mk										ml										mm										mn										mo										mp										mq										mr										ms										mt										mu										mv										mw										mx										my										mz										na										nb										nc										nd										ne										nf										ng										nh										ni										nj										nk										nl										nm										nn										no										np										nq										nr										ns										nt										nu										nv										nw										nx										ny										nz										oa										ob										oc										od										oe										of										og										oh										oi										oj										ok										ol										om										on										oo										op										oq										or										os										ot										ou										ov										ow										ox										oy										oz										pa										pb										pc										pd										pe										pf										pg										ph										pi										pj										pk										pl										pm										pn										po										pp										pq										pr										ps										pt										pu										pv										pw										px										py										pz										qa										qb										qc										qd										qe										qf										qg										qh										qi										qj										qk										ql										qm										qn										qo										qp										qq										qr										qs										qt										qu										qv										qw										qx										qy										qz										ra										rb										rc										rd										re										rf										rg										rh										ri										rj										rk										rl										rm										rn										ro										rp										rq										rr										rs										rt										ru										rv										rw										rx										ry										rz										sa										sb										sc										sd										se										sf										sg										sh										si										sj										sk										sl										sm										sn										so										sp										sq										sr										ss										st										su										sv										sw										sx										sy										sz										ta										tb										tc										td										te										tf										tg										th										ti										tj										tk										tl										tm										tn										to										tp										tq										tr										ts										tt										tu										tv										tw										tx										ty										tz										ua										ub										uc										ud										ue										uf										ug										uh										ui										uj										uk										ul										um										un										uo										up										uq										ur										us										ut										uu										uv										uw										ux										uy										uz										va										vb										vc										vd										ve										vf										vg										vh										vi										vj										vk										vl										vm										vn										vo										vp										vq										vr										vs										vt										vu										vv										vw										vx										vy										vz										wa										wb										wc										wd										we										wf										wg										wh										wi										wj										wk										wl										wm										wn										wo										wp										wq										wr										ws										wt										wu										wv										ww										wx										wy										wz										xa										xb										xc										xd										xe										xf										xg										xh										xi										xj										xk										xl										xm										xn										xo										xp										xq										xr										xs										xt										xu										xv										xw										xx										xy										xz										ya										yb										yc										yd										ye										yf										yg										yh										yi										yj										yk										yl										ym										yn										yo										yp										yq										yr										ys										yt										yu										yv										yw										yx										yy										yz										za										zb										zc										zd										ze										zf										zg										zh										zi										zj										zk										zl										zm										zn										zo										zp										zq										zr										zs										zt										zu										zv										zw										zx										zy										zz									
		95312	79437	32929	42913	72325	91206	96125	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		

X.3 16S rRNS gén szekvenciák megoszlása a *Bacteria* divíziók között (RDP 10.12)

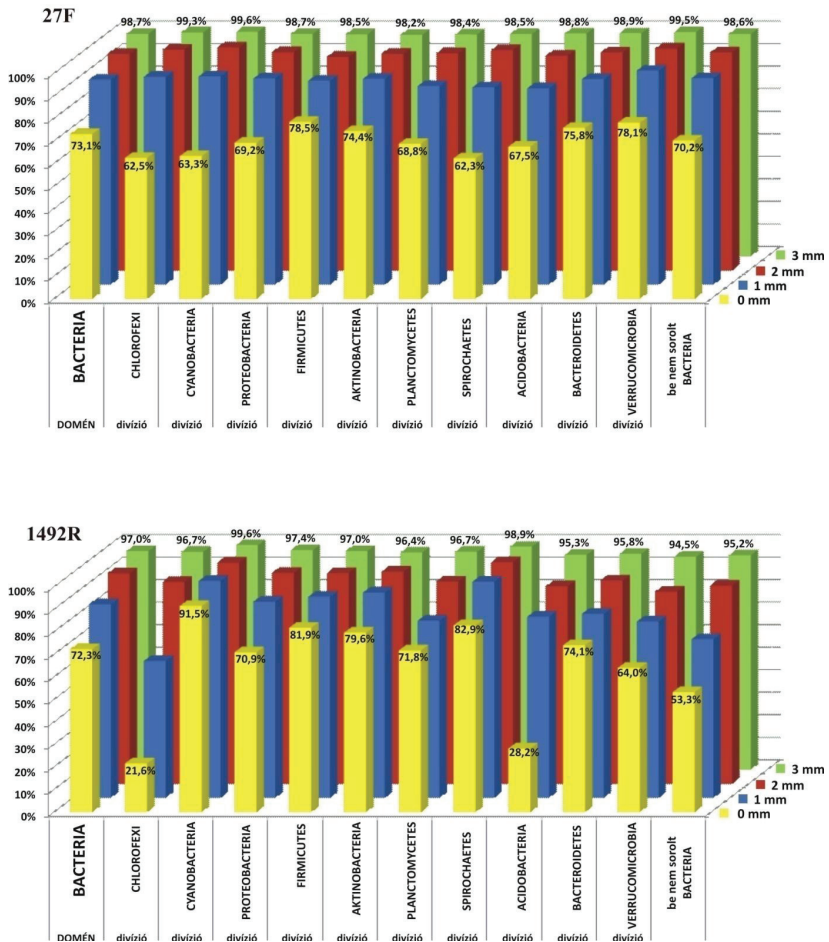
41. ábra. Az RDP-II 10.12 verzió alapján (2009.06.10.) a „jó” minőségű 16S rRNS szekvenciák megoszlása a különböző *Bacteria* csoportokon belül (sárga). Csak a 0,5%-nál nagyobb arányban képviselt divíziókat (összes szekvencia 97,6%-a) és a DGGE esettanulmányhoz szükséges *Deinococcus-Thermus* csoportot ábrázoltuk. A „jó” minőségű 16S rRNS szekvenciákon belül (sárga) a „nem-tenyésztett” szekvenciák csoportonkénti megoszlását kékkkel jelöltük

X.4 A 968F-1401R (IV-es primerpár) primerek illeszkedése (RDP 10.12)



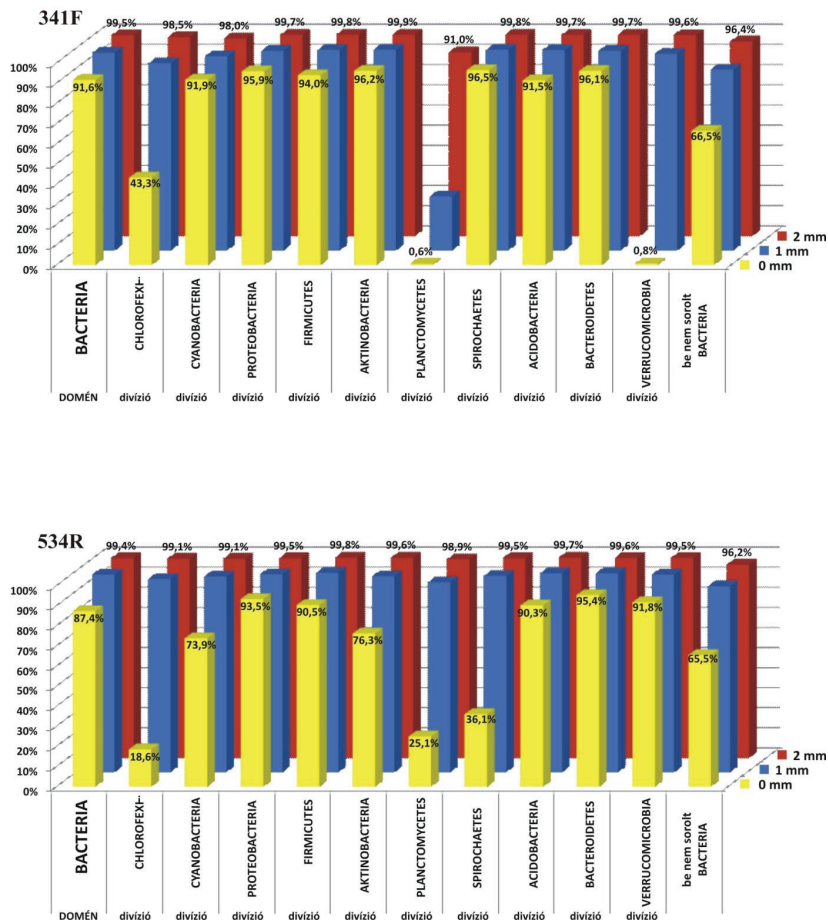
42. ábra. A 968F és 1401R primerek *in silico* illeszkedése a Bacteria domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a Probe Match alapján). A megadott százalékos értékek rendre a különböző mértékben illeszkedő szekvenciák arányát jelölik az összes olyan „jó minőségű” szekvenciához képest, amely 968F esetében az *E. coli* 968-984 (476 446 db 16S rRNS gén szekvencia) illetve 1401R esetében az *E. coli* 1385-1401 tartományokban (303 070 db 16S rRNS gén szekvencia) nukleotidot tartalmaz.

X.5 A 27F-1492R primerek illeszkedése (RDP 10.12)



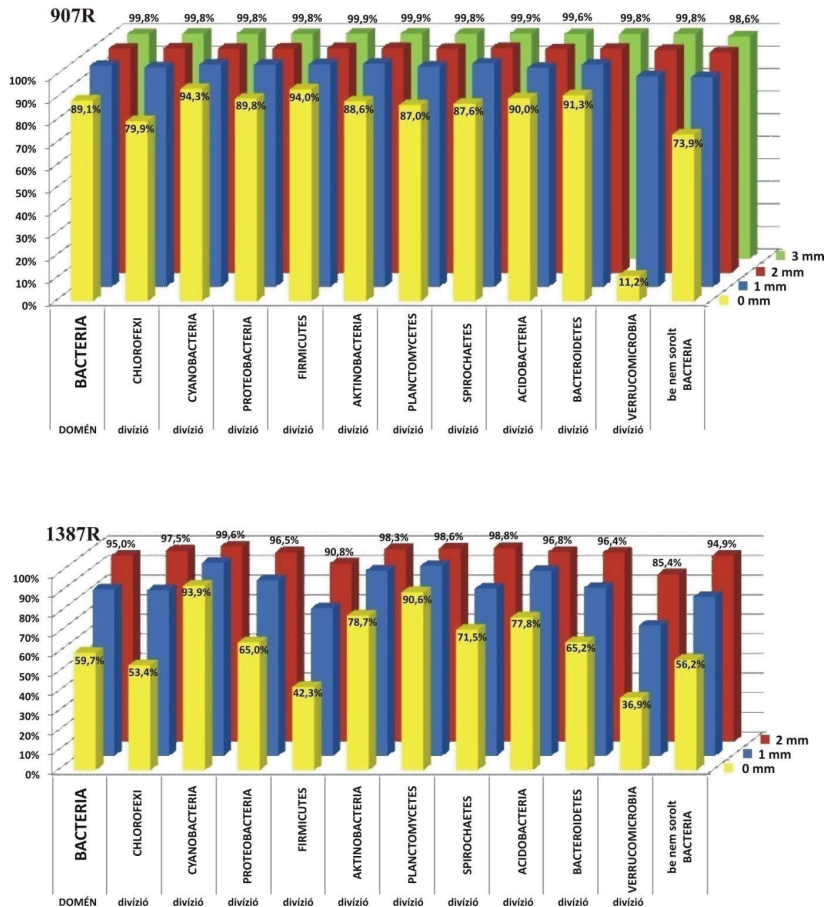
43. ábra. A 27F és 1492R primerek *in silico* illeszkedése a *Bacteria* domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a *Probe Match* alapján). A megadott százalékos értékek rendre a különböző mértékben illeszkedő szekvenciák arányát jelölik az összes olyan „jó minőségű” szekvenciához képest, amely 27F esetében az *E. coli* 8-27 (192 215 db 16S rRNS gén szekvencia) illetve 1492R esetében az *E. coli* 1492-1513 tartományokban (54 214 db 16S rRNS gén szekvencia) nukleotidot tartalmaz.

X.6 A 341F-534R (III-as primerpár) primerek illeszkedése (RDP 10.12)



44. ábra. A 341F és 534R primerek *in silico* illeszkedése a *Bacteria* domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a *Probe Match* alapján). A megadott százalékos értékek rendre a különböző mértékben illeszkedő szekvenciák arányát jelölik az összes olyan „jó minőségű” szekvenciához képest, amely 341F esetében az *E. coli* 341-357 (649 443 db 16S rRNS gén szekvencia) illetve 534R esetében az *E. coli* 518-534 tartományokban (652 798 db 16S rRNS gén szekvencia) nukleotidot tartalmaz.

X.7 A 907R-1387R primerek illeszkedése (RDP 10.12)



45. ábra. A 907R és 1387R primerek *in silico* illeszkedése a *Bacteria* domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a *Probe Match* alapján). A megadott százalékos értékek rendre a különböző mértékben illeszkedő szekvenciák arányát jelölik az összes olyan „jó minőségű” szekvenciához képest, amely 907R esetében az *E. coli* 907-926 (508 176 db 16S rRNS gén szekvencia) illetve 1387R esetében az *E. coli* 1387-1404 tartományokban (296 427 db 16S rRNS gén szekvencia) nukleotidot tartalmaz.

X.8 Rövidítésjegyzék

A _{260/280/320}	abszorbancia az adott hullámhosszon (nm)
APS	ammónium-perszulfát
bp	bázispár
CGE	kapilláris gélelektroforézis (<i>Capillary Gel Electrophoresis</i>)
CW	mesterséges láp (<i>Constructed Wetland</i>)
DDBJ	<i>DNA Data Bank of Japan</i>
ddNTP	didezoxi-ribonukleotid-5'-trifoszfát
DEPC	dietilpirokarbonát
DGGE	denaturáló gradiens gélelektroforézis (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxi-ribonukleotid-5'-trifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>)
IFU	fluoreszcens intenzitás egység
INSDC	<i>International Nucleotide Sequence Database Collaboration</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LH PCR	PCR hossz-heretogenitás (<i>Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction</i>)
LPSN	<i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>
MDA	<i>Multiple Displacement Amplification</i>
NMDS	nem-metrikus többdimenziós skálázás (<i>Non-Metric Multidimensional Scaling</i>)
OD	optikai denzitás
OTU	taxonómiai alapegység (<i>Operational Taxonomic Unit</i>)
PAA	poliakrilamid
PCR	polimeráz láncreakció (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Phr	nád (<i>Phragmites australis</i>)
PLFA	foszfolipid zsírsav (<i>Phospholipid Fatty Acids</i>)
PVPP	polivinil-polipirrolidon
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RE	restrikciós endonukleáz
RISA	<i>Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i>
RNS	ribonukleinsav
rmdb	rRNS operonszám adatbázis (<i>Ribosomal RNA Operon Copy Number Database</i>)
rRNS	riboszómális ribonukleinsav
RS / RP	rizoszféra / rizoplán
SIP	stabil izotóp próba (<i>Stable Isotope Probe</i>)
SNuPE	<i>Single Nucleotide Primer Extension</i>
SSCP	<i>Single-Stranded Conformational Polymorphism</i>
SSU	riboszóma kis alegysége (<i>Small Subunit</i>)
TAE	Tris - ecetsav - EDTA
TAMRA	N,N,N',N'-tetrametil-6-karboxi-rodamin
TBE	Tris - bórsav – EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilén etiléndiamin
TET	tetraklór-fluoreszcein foszforamidit
TGGE	hőmérséklet gradiens gélelektroforézis (<i>Thermal Gradient Gel Electrophoresis</i>)
T-RFLP	terminális restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
Typ	gyékény (<i>Typha latifolia</i>)
UPGMA	csoportátlag módszer (<i>Unweighted Pair Group Method of Average</i>)
WGA	teljes genom amplifikáció (<i>Whole Genome Amplification</i>)

X.9 Ábra-, és táblázatjegyzék

1. ÁBRA. A leírt fajok számának és a SSU rRNS szekvenciák számának változása 1980 és 2007 között	7
2. ÁBRA. A mikrobiális diverzitás-vizsgáló molekuláris módszerek alkalmazása a környezeti mikrobiológiában ...	10
3. ÁBRA. Egy általános PCR reakció és ciklikus hőprofil folyamatának vázlata.....	15
4. ÁBRA. A T-RFLP technika sematikus vázlata.	35
5. ÁBRA. A DGGE technika sematikus vázlata.	37
6. ÁBRA. Merőleges denaturáló gradiens gélelektroforézis	38
7. ÁBRA. A modellrendszert alkotó baktériumtörzseken és a környezeti mintákon végzett molekuláris vizsgálatok vázlata	40
8. ÁBRA. A demjéni gombacsiragyártó üzem mesterséges lápjának vázlata	43
9. ÁBRA. Magyarországi komposztüzem komposztálási folyamatának lépései	45
10. ÁBRA. A kísérletek során alkalmazott „univerzális” 16S rRNS primerek kötőhelyei az <i>Escherichia coli</i> 16S rRNS gén megfelelő szakaszán.	49
11. ÁBRA. Gradiens PCR-reakciótermékek detektálása.	52
12. ÁBRA. PCR ciklusszám vizsgálatával nyert PCR-termékek detektálása.	53
13. ÁBRA. A DGGE ujjlenyomat mintázatok statisztikai elemzésének vázlata	64
14. ÁBRA. A komposzt mintákból származó törzsek és a GC-63F–338R (I.) DGGE futásból visszaizolált parciális 16S rRNS génszekvenciák alapján készített törzsfá.	68
15. ÁBRA. A komposzt mintákból származó törzsek és a GC-968F–1401R (IV.) DGGE futásból visszaizolált parciális 16S rRNS génszekvenciák alapján készített törzsfá	70
16. ÁBRA. Az <i>Ribosomal Database Project</i> -ben található elillesztett 16S rRNS gén szekvenciák számának alakulása az adatbázis 9-es és 10-es verzióinak frissítései során.	72
17. ÁBRA. Az RDP-II 10.12-es verziójának összetétele	74
18. ÁBRA. Az egyes „univerzális” 16S rRNS primerek <i>in silico</i> illeszkedése az RDP-II 10.12-ben szereplő „jó” minőségű, elillesztett 16S rRNS szekvenciákhoz, a <i>Probe Match</i> alapján.	75
19. ÁBRA. A 63F és 338R primerek illeszkedése a <i>Bacteria</i> domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz.....	78
20. ÁBRA. A komposzt PCR-DGGE vizsgálatához használt primerek illeszkedése az RDP 10.12 adatbázis <i>Deinococcus-Thermus</i> , <i>Firmicutes</i> és <i>Actinobacteria</i> divíziók szekvenciáihoz	80
21. ÁBRA. A modellrendszert alkotó négy törzs TET-jelölt terminális fragmentumainak elválasztása kapilláris gélelektroforézissel.	87
22. ÁBRA. A PCR termék arányok T-RFLP detektálási módszer pontosságának ellenőrzése	88
23. ÁBRA. Különböző hosszúságú terminális fragmentumok páronkénti magasság és terület aránya.	89
24. ÁBRA. Az adatfeltárási vizsgálatok során az AH és BC törzsek genomi DNS-ének 1:1 koncentráció arányú keverékéből különböző primerpárokkal előállított PCR termék T-RFLP analízise	92
25. ÁBRA. Az illeszkedési hibák hatása az annelációs hőmérséklet függvényében.....	95
26. ÁBRA. A BC és PF törzsek genomi DNS-ének 1:1 arányú keverékéből TET-63F-1387R primerpárral előállított gradiens PCR termék összetételének elemzése T-RFLP módszerrel.	95
27. ÁBRA. A terminális fragmentumok görbe alatti terület arányai a TET-27F-1387R és a TET-63F-1387R primerekkel előállított PCR termékekben	97
28. ÁBRA. A ciklusszám hatása az AH / BS illetve az AH / PF párok T-RF csúcsainak terület arányaira különböző típusú és összetételű kiindulási DNS templomok esetében	100
29. ÁBRA. Az annelációs hőmérséklet hatása egy gyékény rizoszféra közösség T-RFLP mintázatára.	101
30. ÁBRA. A PCR paraméterek változtatásának hatása egy gyékény rizoplán T-RFLP mintázatára.	102
31. ÁBRA. A gyékény és nád rizoszféra frakciók DGGE ujjlenyomat mintázata négy különböző „univerzális” primerpárral, a 16S rRNS gén variábilis régióinak feltüntetésével.	106
32. ÁBRA. A négy különböző primerpár (I-IV.) DGGE mintázatának elemzésével kapott csíkszámok	107
33. ÁBRA. A GC-63F-338R primerpárral (I.) kapott DGGE ujjlenyomat mintázat statisztikai elemzése.	109
34. ÁBRA. A GC-63F-534R primerpárral (II.) kapott DGGE ujjlenyomat mintázat statisztikai elemzése.....	111
35. ÁBRA. A GC-341F-534R primerpárral (III.) kapott DGGE ujjlenyomat mintázat statisztikai elemzése.	113
36. ÁBRA. A GC-968F-1401R primerpárral (IV.) kapott DGGE ujjlenyomat mintázat statisztikai elemzése.	114
37. ÁBRA. A négy DGGE mintázat egyesítésével kapott mesterséges adatmátrix statisztikai elemzése.....	116

38. ÁBRA. A „nested” (NES) és az egylépéses (DIR) PCR stratégia összehasonlítása DGGE gélkép és hierarchikus osztályozás alapján.	123
39. ÁBRA. A 38/A ábrán jelölt gél háttérfestődésből kinyert, és az I. primerpárral újra szaporított DNS DGGE mintázata alapján nyert hasonlósági dendrogram.	125
40. ÁBRA. A 63F primer <i>in silico</i> illeszkedése a <i>Bacteria</i> domén és a benne foglalt 34 divízió szekvenciáihoz.	i
41. ÁBRA. Az RDP-II 10.12 verzió alapján a „jó minőségű” 16S rRNS szekvenciák megoszlása a különböző <i>Bacteria</i> csoportokon belül.	iii
42. ÁBRA. A 968F és 1401R primerek <i>in silico</i> illeszkedése a <i>Bacteria</i> domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a <i>Probe Match</i> alapján).	iv
43. ÁBRA. A 27F és 1492R primerek <i>in silico</i> illeszkedése a <i>Bacteria</i> domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a <i>Probe Match</i> alapján).	v
44. ÁBRA. A 341F és 534R primerek <i>in silico</i> illeszkedése a <i>Bacteria</i> domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a <i>Probe Match</i> alapján).	vi
45. ÁBRA. A 907R és 1387R primerek <i>in silico</i> illeszkedése a <i>Bacteria</i> domén illetve azon belül 10 divízió szekvenciáihoz (RDP-II 10.12 és a <i>Probe Match</i> alapján).	vii

1. TÁBLÁZAT. Muyzer és mtsai 1993-as cikkében leírt 16S DGGE rRNS génre specifikus primerekre történő irodalmi hivatkozások összehasonlítása.	25
2. TÁBLÁZAT. A gyékény és nád rizoszféra frakciók mintáinak jellemzése és a jelölésükre alkalmazott rövidítések.	44
3. TÁBLÁZAT. A komposztminták jellemzése és a jelölésükre alkalmazott rövidítések.	45
4. TÁBLÁZAT. Általános protokoll 50 µl végtérfogató PCR összemérésére.	48
5. TÁBLÁZAT. Egy általános „hot start” PCR hőprofil felépítése.	48
6. TÁBLÁZAT. A kísérletek során alkalmazott „univerzális” 16S rRNS génre specifikus primerek adatai.	49
7. TÁBLÁZAT. A modellközösség 1:1 koncentráció arányú keverék templatokon és környezeti mintákon több párhuzamos összeméréssel végzett PCR reakciók összetétele 50 µl végtérfogó esetén.	51
8. TÁBLÁZAT. Gradiens PCR hőprofil felépítése, amelyet környezeti mintán és modellközösségi 1:1 koncentráció arányú keverék templatón végeztünk az annelációs hőmérséklet hatásának vizsgálatára.	51
9. TÁBLÁZAT. A komposzt minták és a környezeti rizoszféra frakciók PCR-DGGE analíziséhez használt primerpárok és az általuk amplifikált 16S rRNS gén régiók adatai.	54
10. TÁBLÁZAT. Az I-es (GC-63F-338R) primerpárral végzett „nested” PCR reakció „touch-down” hőprofilja.	54
11. TÁBLÁZAT. A IV-es (GC-968F-1401R) primerpárral végzett „nested” PCR reakció „touch-down” hőprofilja.	55
12. TÁBLÁZAT. A I, II, III, és IV-es DGGE primerpároknál használt PCR hőprofil.	55
13. TÁBLÁZAT. A T-RFLP elemzések során alkalmazott restriktációs endonukleázok tulajdonságai.	57
14. TÁBLÁZAT. A denaturáló poliakrilamid gél öntéséhez szükséges törzsoldatok összetétele.	59
15. TÁBLÁZAT. A denaturáló poliakrilamid gél elkészítése a törzsoldatokból.	59
16. TÁBLÁZAT. A szekvenáló reakció összetétele 50 µl végtérfogó esetén.	60
17. TÁBLÁZAT. A szekvenáló reakció során alkalmazott hőprofil.	61
18. TÁBLÁZAT. Az RDP-II 10.12 verzió alapján az adatbázis 920 643 elillesztett 16S rRNS gén szekvencia megoszlása a <i>Bacteria</i> és <i>Archaea</i> doméneken illetve a különböző szűrő beállításokon.	74
19. TÁBLÁZAT. A modellrendszerben használt baktériumtörzsek <i>in silico</i> terminális fragmentumhosszai a kísérletekben alkalmazott forward primer és restriktációs endonukleáz hasítóhelyének függvényében.	84
20. TÁBLÁZAT. Az „univerzális” 16S rRNS génre specifikus primerek (27F, 63F és 1387R) illeszkedése a modellkísérletekben használt négy baktériumtörzs célszekvenciájával szemben.	93
21. TÁBLÁZAT. A modellrendszerben szereplő fajok genom méretre és rRNS operon számra vonatkozó adatai.	98
22. TÁBLÁZAT. Egy gyékény rizoplán minta mikroba közösségének különböző PCR paraméterek alkalmazásával nyert T-RFLP elemzésének eredménye.	103
23. TÁBLÁZAT. Az RDP-II 10.12-es verziója alapján az adatbázis 920 643 elillesztett 16S rRNS szekvencia megoszlása a <i>Bacteria</i> és <i>Archaea</i> doméneken belül. A különböző „univerzális” 16S rRNS gén primerek illeszkedése az adatbázisban szereplő „jó minőségű” szekvenciákhoz a <i>Probe Match</i> alapján.	ii